

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

Leandro Guarezi Nandi

**CARACTERIZAÇÃO E MODIFICAÇÃO
HIDROFÓBICA DO POLISSACARÍDEO LENTINAN
EXTRAÍDO DO COGUMELO SHIITAKE (*Lentinula edodes*) E
ESTUDOS DA SUA
AUTO-ASSOCIAÇÃO NA PRESENÇA DE SULFOBETAÍNAS**

Dissertação de mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Química da Universidade Federal de
Santa Catarina como requisito parcial
para obtenção do título de Mestre em
Físico-Química.

Florianópolis

2011

Catálogo na fonte elaborada pela biblioteca da
Universidade Federal de Santa Catarina

N176c Nandi, Leandro Guarezi

Caracterização e modificação hidrofóbica do polissacarídeo Lentinan extraído do cogumelo Shiitake (*Lentinula edodes*) e estudos da sua auto-associação na presença de sulfobetaínas [dissertação] / Leandro Guarezi Nandi; orientador, Edson Minatti, co-orientador, Josiel Barbosa Domingos. - Florianópolis, SC, 2011.

108 p.: il., grafs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas. Programa de Pós-Graduação em Química.

Inclui referências

1. Química. 2. Polissacarídeos. 3. Lentinan.
4. Tensoativos. I. Minatti, Edson. II. Domingos, Josiel Barbosa. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química.
- IV. Título.

CDU 54

Leandro Guarezi Nandi

**CARACTERIZAÇÃO E MODIFICAÇÃO
HIDROFÓBICA DO POLISSACARÍDEO LENTINAN
EXTRAÍDO DO COGUMELO SHIITAKE (*Lentinula edodes*) E
ESTUDOS DA SUA
AUTO-ASSOCIAÇÃO NA PRESENÇA DE SULFOBETAÍNAS**

Esta dissertação foi julgada e aprovada para obtenção do título de **Mestre em
Química no Programa de Pós-Graduação em Química** da Universidade
Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 22 de fevereiro de 2011

Prof. Dr. Almir Spinelli
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Edson Minatti
Orientador
QMC-UFSC

Prof. Dr. Josiel B. Domingos
Co-Orientador
QMC-UFSC

Prof. Dr.^a Vera L. A. F. Bascuñan
QMC-UFSC

Prof. Dr. Vanderlei G. Machado
QMC-UFSC

Prof. Dr. Pedro Luiz M. Barreto
CCA-UFSC

AGRADECIMENTOS

Ao orientador professor Dr. Edson Minatti por toda dedicação, conhecimentos transmitidos que fizeram deste trabalho realidade;

Ao Co-orientador Dr. Josiel Barbosa Domingos, pela ajuda e suporte a este trabalho;

Aos professores Vera L. A. Frescura Bascuñan, Vanderlei G. Machado e Pedro Luiz Manique Barreto que participaram da Banca Examinadora;

Aos amigos do POLISSOL:

Ismael, João, Jefferson, Klaiani, Samuel, Samira, Renato, Arlindo, Alexandre.

A minha família pelo apoio durante toda a minha vida;

A Lindsey pelo amor, carinho e compreensão;

A todos os meus amigos;

Aos laboratórios: POLIMAT-UFSC, LACBIO-UFSC, Central de Análises – UFSC, Laboratório de Instrumentação Dinâmica e molecular-UFRGS e ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS);

A Capes pelo suporte financeiro;

A Deus.

RESUMO

As β -Glucanas, polissacarídeos de alta massa molar extraídas da parede celular de cogumelos comestíveis são usadas na medicina devido as suas propriedades bioativas, imunomoduladoras e antitumorais. O Lentinan é uma dessas β -Glucanas extraída da parede celular do cogumelo Shiitake (*Lentinula edodes*) tem sido alvo de muitas pesquisas nos últimos quarenta anos. Nesse presente trabalho o Lentinan foi extraído utilizando o método desenvolvido por Yap e caracterizado utilizando técnicas de Infravermelho e RMN de ^{13}C . Posteriormente o Lentinan foi hidrofóbicamente modificado, introduzindo-se em sua cadeia grupos dodecanoato. Esse derivado do Lentinan foi caracterizado por RMN ^{13}C , Fluorescência. Os resultados de RMN ^{13}C indicaram uma substituição em torno de 10% em relação ao total de hidroxilas presentes no Lentinan. Por espalhamento de luz estático e dinâmico determinou-se massa molar aparente igual a $9,6 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$, raio de giração igual a 154 nm, raio hidrodinâmico de 87 nm e o segundo coeficiente virial igual a $1,01 \times 10^{-3} \text{ mL.mol.g}^{-2}$ para o Lentinan em solução aquosa de NaOH 20 mmol.L $^{-1}$. Enquanto que para o Lentinan hidrofóbicamente modificado em solução aquosa de uréia 500 mmol.L $^{-1}$ o valor de massa molar aparente encontrado foi de $2,34 \times 10^6 \text{ g.mol}^{-1}$, o raio de giração igual a 366 nm, segundo coeficiente virial com o valor de $2,79 \times 10^{-7} \text{ mL.mol.g}^{-2}$ e o raio hidrodinâmico de 490 nm (em 40% DMSO). Os resultados de SAXS confirmaram que o lentinan existe na forma de tripla hélice quando em solução aquosa de NaOH (concentrações menores que 80 mmol.L $^{-1}$) enquanto que para concentrações superiores a 80 mmol.L $^{-1}$ de NaOH o lentinan apresenta-se na forma de hélice simples. Ainda pela técnica de SAXS foi possível determinar o raio de giração lateral para tripla hélice do lentinan, tendo valores de 5 Å à 8 Å dependendo da concentração de NaOH em solução. A interação do Lentinan e derivado, com as sulfobetaínas foram estudados por Fluorescência, Tensão Superficial e Espalhamento de Luz indicando a formação de Complexos do tipo Lentinan/Surfactante e Lentinan modificado/Surfactante através da determinação da concentração de agregação crítica.

Palavras-chave: Polissacarídeos, Lentinan, surfactantes.

ABSTRACT

β -Glucans, high molar mass polysaccharides extracted from the cell wall of edible mushrooms are used in the medical field due to its bioactive, immunomodulatory and antitumor properties. Lentinan, one of these β -Glucans, is extracted from Shiitake mushroom cell wall (*Lentinula edodes*) and has been target of several researches in the past forty years. In this study, Lentinan was extracted using the method developed by Yap e characterized with Infrared and ^{13}C NMR. Afterwards Lentinan was hydrophobically modified, introducing dodecanoate groups in its chains. This Lentinan derivative was characterized by ^{13}C NMR and fluorescence. ^{13}C NMR results indicated a substitution around 10% of total hydroxyls in Lentinan structure. By static and dynamic light scatterings it was determined apparent molar mass of $9,6 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$, radius of gyration of 154 nm, hydrodynamic radius of 87 nm e second virial coefficient of $1,01 \times 10^{-3} \text{ mL.mol.g}^{-2}$ for Lentinan in aqueous solution with $20 \text{ mmol.L}^{-1} \text{ NaOH}$. For hydrophobically modified Lentinan in 500 mmol.L^{-1} urea aqueous solution it was found a apparent molar mass of $2,34 \times 10^6 \text{ g.mol}^{-1}$, radius of gyration of 366 nm, second virial coefficient of $2,79 \times 10^{-7} \text{ mL.mol.g}^{-2}$ and hydrodynamic radius of 490 nm (in 40% DMSO). SAXS results confirmed that Lentinan exists in triple helix form in $\text{NaOH} < 80 \text{ mmol.L}^{-1}$ aqueous solution and simple helix in $\text{NaOH} > 80 \text{ mmol.L}^{-1}$. Also with SAXS it was possible to determine lateral radius of gyration for Lentinan triple helix, with values between 5 Å and 8 Å depending of NaOH concentration. The interaction of Lentinan and derivative with sulfobetaines was estuded by Fluorescence, Surface Tension and Light Scattering indicating the formation of Lentinan/Surfactant and Modified Lentinan/Surfactant complexes through determination of critical aggregation concentration.

Keywords: Polysaccharides, Lentinan, surfactants.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração esquemática de um surfactante [2].....	27
Figura 2. Processo de micelização em solvente polar.....	29
Figura 3. Ilustração da variação de algumas propriedades físico-químicas em função da concentração de surfactante em solução aquosa.....	29
Figura 4. Dependência da ionização com o pH da solução.....	30
Figura 5. Estrutura química dos surfactantes SB3-12 e SB3-14.	31
Figura 6. Representação esquemática de três tipos de cadeias poliméricas.	32
Figura 7. Estruturas moleculares da piranose e furanose.....	33
Figura 8. Estrutura da D-glicose, cadeia aberta, α - e β -D-glicopiranoses, cadeias fechadas e do dímero com ligação glicosídica em posição 1 \rightarrow 3.....	34
Figura 9. Estrutura química do lentinan.....	37
Figura 10. Etapas das associações polímero neutro-surfactante.	39
Figura 11. Espectro de infravermelho obtido do Polissacarídeo Curdlan uma (β -1 \rightarrow 3) Glucana em pastilhas de KBr [38].....	41
Figura 12. Espectro RMN de ^{13}C de uma β -D-glucana extraída do Fungo <i>agaricus Blazei</i> em D ₂ O [39].....	41
Figura 13. Típico gráfico de Zimm para soluções poliméricas.....	46
Figura 14. Esquema ilustrativo para um experimento de SAXS.....	49
Figura 15. Espectros de emissão de fluorescência do monômero do pireno em etanol [54].....	51
Figura 16. Representação da tensão superficial ar-água.	52
Figura 17. Ilustração de uma curva obtida na titulação tensiométrica de surfactante em água, indicando o processo de micelização.	53

Figura 18. Esquema da síntese do Lentinan Hidrofobicamente modificado (LT-dod)	58
Figura 19. Mecanismo genérico da reação de esterificação do lentinan.	64
Figura 20. Espectro de IV do Lentinan feitos em pastilhas de KBr.....	65
Figura 21. Espectro de RMN de ^{13}C do lentinan em DMSO-d ₆	67
Figura 22. Espectro de RMN de ^{13}C do lentinan modificado (LT-Dod) em DMSO-d ₆	69
Figura 23. Esquema com o deslocamento químico teórico em ppm para cada carbono presente no ácido dodecanóico.	70
Figura 24. Razão I_1/I_3 versus a concentração de polímero LT (■) e LT-Dod (○).	71
Figura 25. Gráfico de Zimm parcial para a dependência angular do espalhamento de luz de solução aquosa do lentinan ($c=0,1\text{mg.mL}^{-1}$) em NaOH 20 mmol.L^{-1}	73
Figura 26. Gráfico de Zimm parcial para o espalhamento de luz de soluções aquosas de lentinan em NaOH 20 mmol.L^{-1} medidas em ângulo constante ($\theta=90^\circ$).	74
Figura 27. Gráfico de Zimm parcial para a dependência angular do espalhamento de luz para o LT-Dod $0,1\text{mg.mL}^{-1}$ em solução aquosa de uréia 500 mmol.L^{-1}	75
Figura 28. Gráfico de Zimm parcial para a dependência da intensidade do espalhamento de luz com a concentração de LT-Dod em soluções aquosas de uréia 500 mmol.L^{-1} no ângulo de 90°	76
Figura 29. Curvas g_2 de autocorrelação de DLS no ângulo de 90° para o lentinan (■) em água (○) e em 80 mmol.L^{-1} NaOH.	77
Figura 30. Histograma de distribuição de tamanho dado pela inversão de CONTIN da curva de autocorrelação no ângulo de 90°	77
Figura 31. Dependência do raio hidrodinâmico do lentinan em função da concentração de NaOH.	78

Figura 32. Dependência do Raio Hidrodinâmico versus a concentração de DMSO em água .	79
Figura 33. Dependência angular da intensidade de espalhamento $I(q)$ para o lentinan em pó a 25 °C, com a indicação do coeficiente angular da região de altos ângulos.	81
Figura 34. Dependência angular da intensidade de espalhamento $I(q)$ para soluções aquosas com 1mg.mL^{-1} de lentinan em várias concentrações NaOH a 25°C, com indicação do coeficiente angular das regiões lineares a altos ângulos. Cada curva foi verticalmente deslocada por um fator A.	82
Figura 35. Gráfico de Kratky para soluções aquosas com 1mg.mL^{-1} de Lentinan em varias concentrações de NaOH a 25°C.	83
Figura 36. Ilustração da transição de tripla hélice para hélice simples das cadeias de lentinan.	84
Figura 37. Dependência angular do termo $\ln I(q)q$ para soluções aquosas com 1mg.mL^{-1} de Lentinan em varias concentrações de NaOH a 25°C. Os valores de $\ln I(q)q$ para os sistemas contendo NaOH foram verticalmente deslocados por um fator A para melhor visualização.	85
Figura 38. Esquema da visão superior da tripla hélice do lentinan. As linhas pontilhadas em verde representam as ligações de hidrogênio que mantêm as cadeias do lentinan unidas.	86
Figura 39. Razão I_1/I_3 versus a concentração de SB3-12 em água (\square).	87
Figura 40. Razão I_1/I_3 versus a concentração de SB3-14 em água (\bullet).	88
Figura 41. Tensão superficial versus \ln [SB3-12] em solução aquosa a 25°C.	89
Figura 42. Tensão superficial versus \ln [SB3-14] em solução aquosa a 25°C.	89
Figura 43. Razão I_1/I_3 vs. Concentração de SB3-12 na ausência (\square) e na presença de $0,5\text{mg.mL}^{-1}$ de Lentinan (\blacksquare).	91
Figura 44. Razão I_1/I_3 vs. Concentração de SB3-14 na ausência (\bullet) e na presença de $0,5\text{mg.mL}^{-1}$ de Lentinan (\square).	92
Figura 45. Tensão superficial versus \ln [SB3-12] na ausência (\square) e na presença de $0,5\text{mg.mL}^{-1}$ de Lentinan (\bullet)em solução aquosa a 25°C.	93

Figura 46. Tensão superficial *versus* $\ln[\text{SB3-14}]$ na ausência (\square) e na presença de $0,5\text{mg.mL}^{-1}$ de Lentinan (\bullet) em solução aquosa a 25°C94

Figura 47. Intensidade de luz espalhada para o sistema e SB3-12/Lentinan (\circ) na ausência (\blacksquare) e na presença de $0,5\text{ mg.mL}^{-1}$ de lentinan95

Figura 48. Intensidade de luz espalhada a 90° para o sistema e SB3-14/Lentinan (\blacksquare) na ausência (\circ) e na presença de $0,5\text{mg.mL}^{-1}$ de Lentinan95

Figura 49. Razão I_1/I_3 vs. Concentração de SB3-12 na ausência (\circ) e na presença de $0,5\text{ mg.mL}^{-1}$ de lentinan (\blacksquare).97

Figura 50. Razão I_1/I_3 vs. Concentração de SB3-14 na ausência (\circ) e na presença de $0,5\text{ mg.mL}^{-1}$ de LT-Dod(\blacksquare).97

Figura 51. Auto-organização de polímeros hidrofobicamente modificados e sua associação com surfactantes [4].....98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Alguns exemplos de surfactantes.	28
Tabela 2. Fonte, tipo e bioatividade de algumas Glucanas Fúngicas [19]	36
Tabela 3. Principais bandas de absorção no infravermelho observadas para o lentinan.	65
Tabela 4. Deslocamento químico dos sinais de RMN de ^{13}C para o lentinan. .	68
Tabela 5. Parâmetros físico-químicos obtidos para o LT-Dod por SLS.	75
Tabela 6. Razões Água/DMSO utilizadas para fazer as soluções de LT-Dod empregadas no calculo do raio hidrodinâmico.	79
Tabela 7. Parâmetros físico-químicos obtidos para o lentinan em NaOH 20mmol.L ⁻¹	80
Tabela 8. Parâmetros físico-químicos obtidos para o LT-Dod.	80
Tabela 9. Relação entre dimensão fractal e a topologia [14, 44, 71].	81
Tabela 10. Raio de giração lateral obtidos para o lentinan em diferentes concentrações de NaOH.	86
Tabela 11. Concentração de agregação crítica obtidos por fluorescência para o LT e LT-Dod.	98

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LT	Lentinan
LT-Dod	Lentinan hidrofobicamente modificado
SB3-12	<i>N</i> -Dodecil- <i>N,N</i> -dimetil-3-amônio-1-propanossulfonato
SB3-14	<i>N</i> -Tetradecil- <i>N,N</i> -dimetil-3-amônio-1-propanossulfonato
DMSO	Dimetil sulfóxido
<i>cmc</i>	Concentração micelar crítica
<i>cac</i>	Concentração de agregação crítica
<i>psp</i>	Ponto de saturação do polímero
I_1	Intensidade de fluorescência do pireno obtido em 372,8 nm
I_3	Intensidade de fluorescência do pireno obtido em 384,0 nm
Γ_{\max}	Concentração em excesso na superfície
A_{\min}	Área mínima por molécula de surfactante
γ	Tensão superficial
γ_0	Tensão superficial do solvente
mmol.L ⁻¹	milimol por litro
<i>c*</i>	concentração de <i>overlap</i> ou concentração de sobreposição
<i>c</i>	concentração
[]	Concentração em mol.L ⁻¹
η	Viscosidade do soluto
η_0	Viscosidade do solvente
<i>s</i>	Segundos
<i>R</i>	Constante dos gases ideais
N_A	Constante de Avogadro
SLS	Espalhamento de luz estático
DLS	Espalhamento de luz dinâmico
R_θ	Razão de Rayleigh
I_θ	Intensidade de Luz Espalhada
I_0	Intensidade de Luz Incidente
<i>r</i>	Distância entre a partícula e o detector
θ	Ângulo de Espalhamento
<i>n</i>	Índice de refração do solvente
<i>dn/dc</i>	Taxa de Incremento do índice de refração com a concentração do soluto
λ	Comprimento de Onda da Radiação
k_B	Constante de Boltzmann
<i>K</i>	Constante óptica
A_2	Segundo coeficiente virial

q	Vetor de onda ou vetor de espalhamento
D	Coefficiente de difusão
Γ	Constante de correlação ou de relaxação
R_g	Raio de giro ou de giração
R_H	Raio hidrodinâmico
$M_{w,app}$	Massa molar média aparente
A	Amplitude
DCC	Dicicloexilcarbodiimida
DMAP	4-dimetilaminopiridina
DHU	Diciclohexiluréia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	27
1.1 RELEVÂNCIAS E JUSTIFICATIVAS	27
1.2 SURFACTANTES	27
1.3 CONCENTRAÇÃO MICELAR CRÍTICA	28
1.4 SURFACTANTES ZWITTERIÔNICOS	30
1.5 POLÍMEROS	31
1.6 POLISSACARÍDEOS	32
1.7 BETA GLUCANAS FÚNGICAS	35
1.8 LENTINAN	37
1.9 INTERAÇÃO POLÍMERO-SURFACTANTE	38
1.10 DEFINIÇÕES DAS TÉCNICAS	40
1.10.1 Espectroscopia de infravermelho	40
1.10.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN de ¹³ C).....	41
1.10.3 Espalhamento de Luz Estático (SLS)	42
1.9.4 Espalhamento de luz dinâmico (DLS).....	47
1.10.5 Espalhamento de Raios-X a baixos ângulos (SAXS).....	48
1.10.6 Fluorescência.....	50
1.10.7 Tensão Superficial	51
2.OBJETIVOS.....	55
3.PARTE EXPERIMENTAL	57
3.1 MATERIAIS E REAGENTES	57
3.2 EQUIPAMENTOS E MÉTODOS UTILIZADOS	57
3.2.1 Extração pelo método de Yap	57
3.2.2 Síntese do lentinan (lentinan-Dod) hidrofobicamente modificado.	58
3.2.3 Análises de IV	59
3.2.4 Análises de RMN DE ¹³ C	59
3.2.5 Espalhamento de luz estático.....	59
3.2.6 Espalhamento de Luz dinâmico	59
3.2.7 Espalhamento de raios-x a baixos ângulos (SAXS).....	60
3.2.8 Tensiometria	60
3.2.9 Fluorescência.....	60
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
4.1 EXTRAÇÃO DO LENTINAN	63
4.2 SÍNTESE DO LENTINAN MODIFICADO (LT-Dod).	63

4.3 CARACTERIZAÇÃO DO LENTINAN E LENTINAN MODIFICADO (LT-DOD)	64
4.3.1 Espectrofotometria – de IV para o lentinan.....	64
4.3.2 Espectrometria de RMN de ^{13}C para o lentinan	66
4.3.3 Espectrometria de RMN de ^{13}C para o LT-Dod.....	68
4.3.4 Fluorescência do Pireno para os sistemas LT e LT-Dod.....	71
4.3.5 Determinação da massa molar do lentinan por espalhamento de luz estático.....	72
4.3.6 Determinação da massa molar do lentinan modificado (LT-Dod) por espalhamento de luz estático.	74
4.3.7 Determinação do raio hidrodinâmico do lentinan por espalhamento de luz dinâmico (DLS).....	76
4.3.8. Determinação do Raio Hidrodinâmico do LT-Dod por Espalhamento de Luz Dinâmico.....	78
4.4 TRANSIÇÃO DE TRIPLA-HÉLICE PARA HÉLICE SIMPLES DO LENTINAN EM ÁGUA INVESTIGADA POR ESPALHAMENTO DE RAIOS-X A BAIXOS ÂNGULOS (SAXS).	80
4.4.1 Estrutura fractal do Lentinan.....	80
4.4.2 Gráfico de Kratky.....	83
4.4.3 Calculo do raio de giracão lateral (R_{gc}).....	84
4.5 MEDIDAS DE FLUORESCÊNCIA E TENSÃO SUPERFICIAL PARA OS SURFACTANTES SB3-12 E SB3-14.	87
4.5.1 Medidas de Fluorescência para a SB3-12 e SB3-14.....	87
4.5.2 Medidas de tensão superficial para a SB3-12 e SB3-14.	88
4.6 AUTO-ASSOCIAÇÃO DO LENTINAN E LT-DOD COM SB3-12 E SB3-14.	91
4.6.1 Medidas de fluorescência para os sistemas LT/SB3-12 e LT/SB3-14.	91
4.6.2 Medidas de tensão superficial para os sistemas LT/SB3-12 e LT/SB3-14.	92
4.6.3 Intensidade do espalhamento de luz estático para os sistemas LT/SB3-12 e LT/SB3-14.	94
4.6.4 Medidas de Fluorescência para os sistemas LT-Dod/SB3-12 e LT-Dod/SB3-14.	96
5.CONCLUSÕES	99
6. REFERÊNCIAS	102

1 INTRODUÇÃO

1.1 RELEVÂNCIAS E JUSTIFICATIVAS

Os polissacarídeos têm sido objeto de intensa pesquisa, tendo em vista seu elevado potencial de aplicação em diferentes setores industriais e acadêmicos [1]. Os polissacarídeos presentes em fungos, como as β -Glucanas tem sido extensivamente estudados pelos países orientais como Japão e China (cerca de 90% dos trabalhos encontrados na literatura). O grande uso de fungos na culinária e medicina popular desses países despertou esse grande interesse da comunidade científica.

Se procurarmos na literatura veremos que são muitos os estudos focados na relação entre a conformação molecular e atividade antitumoral do Lentinan e outras β -Glucanas, mas pouco ou nada se sabe sobre a interação e comportamento dessas β -Glucanas e seus derivados hidrofobicamente modificados frente a moléculas anfifílicas como os surfactantes. Tais informações podem ser muito úteis para futuros estudos, aplicações na formação de sistemas de liberação controlada de fármacos, emulsões, nanopartículas, tendo em vista o grande potencial de polissacarídeos como o Lentinan.

1.2 SURFACTANTES

Os Surfactantes (do inglês *surface active agents*) ou agentes com atividade na superfície, possuem a tendência de adsorver-se em superfícies e interfaces. São moléculas anfifílicas que possuem uma cauda hidrofóbica não polar, geralmente um hidrocarboneto linear ou ramificado e uma cabeça hidrofílica, polar ou iônica. (figura 1).

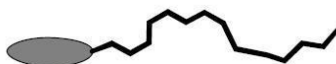


Figura 1. Ilustração esquemática de um surfactante [2].

Em meio aquoso, a parte hidrofóbica do surfactante interage fracamente com as moléculas de água. Por outro lado a cabeça polar

interage fortemente com água via interações dipolo ou íon-dipolo, conferindo a molécula de surfactante solubilidade em água [2].

Dentre as diversas maneiras de classificar as moléculas de surfactantes, existe a classificação baseada na natureza do grupo hidrofílico:

→ Surfactantes **aniônicos**: possuem na parte hidrofílica da molécula um átomo ou um grupo carregado negativamente.

→ Surfactantes **catiônicos**: possuem na parte hidrofílica da molécula um átomo ou um grupo carregado positivamente.

→ Surfactantes **não-iónicos**: a parte hidrofílica da molécula é formada por um grupo polar sem carga residual, que interagem fortemente com a água através de ligações de hidrogênio.

→ Surfactantes **zwitteriônicos ou anfóteros**: apresentam na porção hidrofílica da molécula um grupo aniônico e um grupo catiônico, mudando sua ionicidade de acordo com o pH do meio em que se encontram [3].

Tabela 1. Alguns exemplos de surfactantes.

Surfactante	Formula	Classificação
Dodecil sulfato de sódio (SDS)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{SO}_4^- \text{Na}^+$	aniônico
Brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{Br}^-$	catiônico
Miristil sulfobetaina (SB3-14)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13}\text{N}^+(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$	zwitteriônico
Octil Fenol etoxilado (Triton X-100)	$\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n$ ($n = 9-10$)	não-Iônico

1.3 CONCENTRAÇÃO MICELAR CRÍTICA

Uma das propriedades fundamentais dos surfactantes é a capacidade que suas moléculas têm de formar agregados em solução, chamados de micelas. A formação de micela ou micelização (Figura 2)

pode ser visto como um mecanismo utilizado para reduzir o contato dos grupos hidrofóbicos dos monômeros com a água, reduzindo assim a energia livre do sistema [4]. A formação de micelas ocorre em uma concentração mínima de surfactante conhecida como concentração micelar crítica (*cmc*). Esse é um processo dinâmico sendo que a meia vida é definida na ordem de 10^{-3} a 10^{-6} segundos, dependendo do tamanho da molécula. O tamanho dos agregados micelares é usualmente determinado pelo *número de agregação* que corresponde ao número de moléculas de surfactante por micela [5].

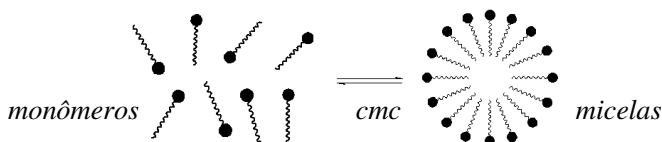


Figura 2. Processo de micelização em solvente polar.

Sua formação pode ser detectada através de medidas de variação de propriedades físicas em função da concentração do surfactante. As propriedades mais utilizadas são: tensão superficial, condutividade elétrica, espalhamento de luz, pH, solubilidade, calor específico, densidade, propriedades ópticas, ressonância magnética nuclear, pressão osmótica, solubilidade e espectroscopia de Fluorescência. A *cmc* é observada durante uma mudança brusca nestas propriedades físicas, conforme é ilustrado na Figura 3 [5].

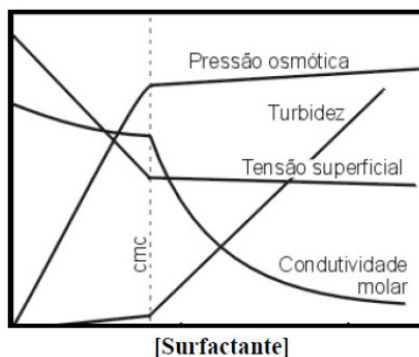


Figura 3. Ilustração da variação de algumas propriedades físico-químicas em função da concentração de surfactante em solução aquosa.

Para uma série homóloga de surfactantes, iônicos ou neutros, o aumento da hidrofobicidade do grupo não-polar leva a uma diminuição da *cmc*. O decréscimo da *cmc* é ainda mais pronunciado para surfactantes não-iônicos. O acréscimo de um grupo metileno à região hidrofóbica faz com que a *cmc* seja reduzida a, praticamente, um terço do valor original.

O aumento de hidrofobicidade gerado pelo incremento do comprimento da cadeia apolar também causa um aumento no tamanho da micela, isto é, um maior número de agregação [6].

1.4 SURFACTANTES ZWITTERIÔNICOS

Trata-se de surfactantes que possuem grupo catiônico e aniônico constituindo sua parte hidrofílica. O nome zwitteriônico deriva do termo alemão *zwitter*, que significa hermafrodita. A principal característica dos tensoativos zwitteriônicos é sua dependência ao pH da solução onde se encontram. A molécula adquire carga positiva quando em pH ácido, comportando-se como um surfactante catiônico, enquanto que em meio alcalino, possuem comportamento de um surfactante aniônico. Ainda, em determinado pH, chamado de ponto isoelétrico (Figura 4), ambas as cargas estão ionizadas, comportando-se muitas vezes como um surfactante não iônico.

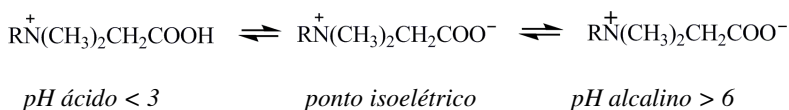


Figura 4. Dependência da ionização com o pH da solução.

A mudança da carga com o pH também afeta as propriedades desses surfactantes, como a molhabilidade, detergência e formação de espuma. Surfactantes zwitteriônicos apresentam grande solubilidade em água (alcançando um mínimo no ponto isoelétrico), excelentes propriedades dermatológicas, baixa irritação aos olhos e frequentemente são usados em xampus e cosméticos. Sua atividade superficial é amplamente dependente da distância entre o grupo catiônico e aniônico, apresentando uma máxima atividade no ponto isoelétrico. Esse grupo de surfactante ainda possui a capacidade de se associar com outros surfactantes, formando micelas mistas [2, 4].

Existe um grupo de surfactantes zwitteriônicos, o grupo das sulfobetainas, que são insensíveis ao pH do meio em que se encontram (em determinado pH não agem apenas como surfactante catiônico ou aniônico). Esse grupo possui a fórmula geral $\text{RN}^+(\text{CH}_3)_2(\text{CH}_2)_x\text{SO}_3^-$ e são adsorvidos a superfícies carregadas em todos os pHs sem formar filmes hidrofóbicos. Possuem uso semelhante aos outros surfactantes zwitteriônicos [7].

Neste trabalho foram usados dois surfactantes do grupo das sulfobetainas, *N*-Dodecil-*N,N*-dimetil-3-amônio-1-propanossulfonato (SB3-12) e *N*-Tetradecil-*N,N*-dimetil-3-amônio-1-propanossulfonato (SB3-14) representados na Figura 5.

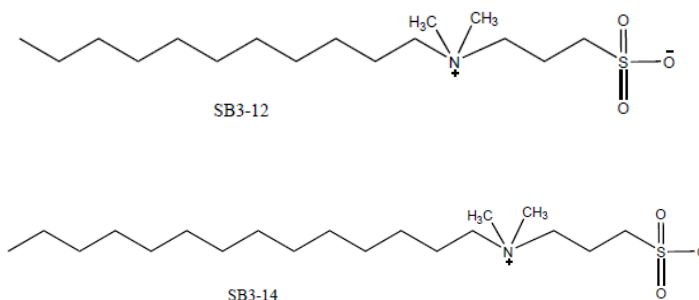


Figura 5. Estrutura química dos surfactantes SB3-12 e SB3-14.

1.5 POLÍMEROS

A palavra polímero origina-se do grego *Poli* (muitos) e *mero* (unidade de repetição). Assim um polímero é uma macromolécula composta por muitas (de algumas dezenas a milhares) unidades de repetição denominadas meros, ligados covalentemente. A matéria prima para a produção de um polímero é o monômero, isto é, uma molécula com uma (*mono*) unidade de repetição [8]. Em alguns casos, esta repetição forma uma cadeia polimérica linear. Em outros casos a cadeia é ramificada ou interconectada podendo formar uma rede tridimensional. A Figura 6 mostra estes três tipos de cadeias poliméricas [4].

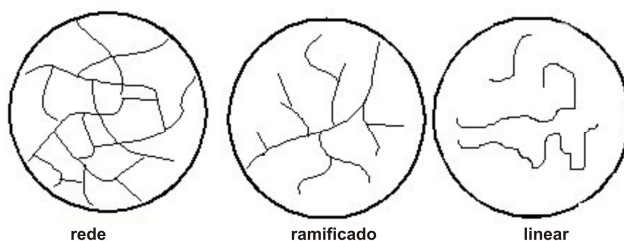


Figura 6. Representação esquemática de três tipos de cadeias poliméricas.

Pode-se dividir as macromoléculas em dois grandes grupos: os *polímeros sintéticos*, que não são de ocorrência natural; e os polímeros naturais ou *biopolímeros* são polímeros de ocorrência natural, porém também podem ser sintetizados em laboratório. Geralmente, os biopolímeros apresentam maior complexidade em sua estrutura química quando comparados com os polímeros sintéticos. Também possuem menor estabilidade térmica e são mais biodegradáveis que os sintéticos [9]

Os biopolímeros estão subdivididos em três grupos: polipeptídeos, polinucleotídeos e polissacarídeos.

1.6 POLISSACARÍDEOS

Polímeros de açúcares também são chamados de polissacarídeos, que são macromoléculas naturais encontradas em todos os organismos vivos, constituindo um grupo de compostos dos mais abundantes e importantes da biosfera como, por exemplo, celulose e amido nas plantas e glicogênio nos animais [1]. Eles são de alta massa molar ($25-15.000 \text{ kg.mol}^{-1}$), formados por moléculas de monossacarídeos.

Para poder entender a nomenclatura e a composição dos polissacarídeos, é necessário conhecer as características dos monômeros que, neste caso, são os monossacarídeos.

Monossacarídeo é um carboidrato que não pode ser hidrolisado em um composto mais simples e um dissacarídeo é um carboidrato que pode ser hidrolisado em duas moléculas de monossacarídeos. Carboidratos por sua vez, são poliidroxialdeídos ou poliidroxicetonas, ou substâncias que produzem estes compostos por hidrólise.

Se um monossacarídeo possui um grupo aldeído, ele é conhecido como aldose; se contém um grupo cetona é conhecido como

cetose. Um monossacarídeo é dado pela fórmula química $C_nH_{2n}O_n$, onde $n=3$ à 10. Pentose ($n=5$) e hexose ($n=6$) são as formas mais abundantes na natureza. Na Figura 7 têm-se exemplos de uma estrutura básica formada por um anel de furanose (anel de cinco membros) e uma piranose (anel de seis membros) [10, 11].

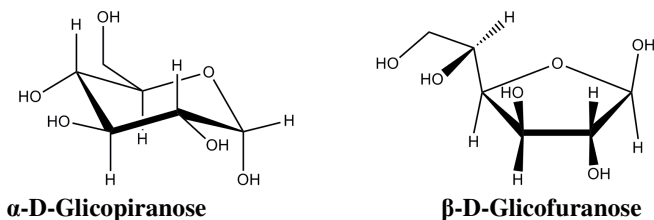


Figura 7. Estruturas moleculares da piranose e furanose.

Os principais monossacarídeos encontrados nos polissacarídeos são a D-xilose, D-manose, D-galactose, D-glicose e o ácido D-glucurônico. Esses açúcares levam a nomenclatura D quando o grupo hidróxi ligado ao centro de quiralidade de maior numeração for representado à direita pela projeção de Fischer (Figura 8). A estrutura cíclica desse composto é formada pela reação do grupo OH ligado ao carbono C-5 com a carbonila do carbono C-1, para formar um anel de seis átomos (piranose). O novo centro de quiralidade gerado é denominado carbono anomérico (C-1). Os dois estereoisômeros são denominados como anômeros, designados α e β de acordo com a relação configuracional entre o centro anomérico e um átomo específico de referência. . No caso da glicose, as duas formas resultantes são a α -D-glicopirranose e a β -D-glicopirranose.

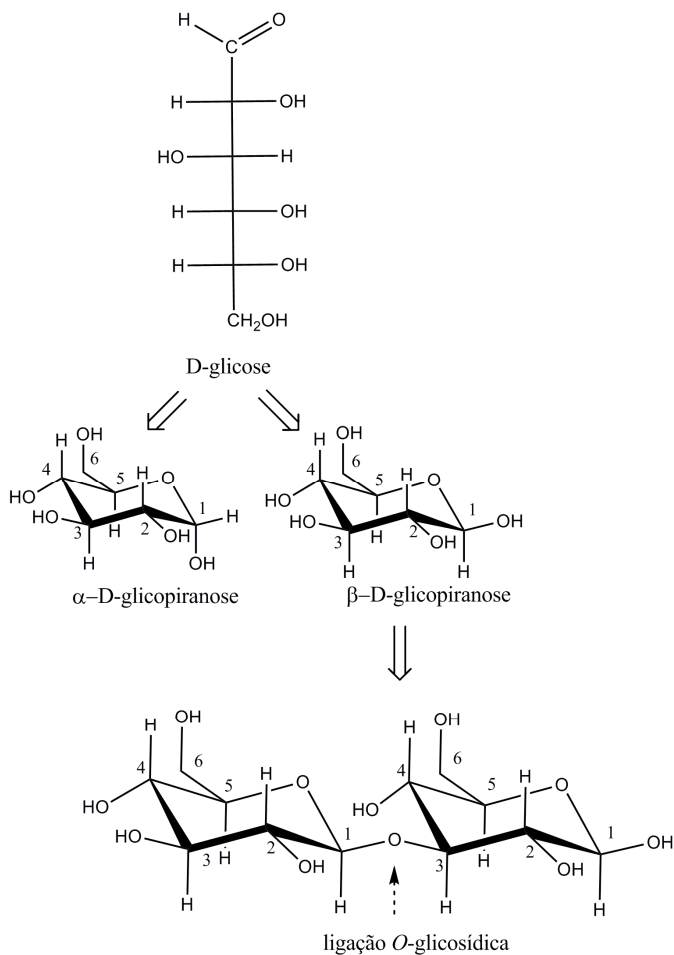


Figura 8. Estrutura da D-glicose, cadeia aberta, α- e β-D-glicopirranoses, cadeias fechadas e do dímero com ligação glicosídica em posição 1→3.

Esses monômeros cíclicos unem-se por meio de ligações O-glicosídicas. Essas ligações podem ser do tipo 1→3, quando o carbono 1 (C1) de um monômero liga-se ao carbono 3 (C3) do monômero seguinte; 1→4, quando o C1 de um monômero liga-se ao C4 do outro; e 1→6, quando o C1 de um monômero liga-se ao C6 do monômero seguinte [10, 12].

Os polissacarídeos, dependendo do tipo de unidade monomérica, ainda podem ser classificados como homopolissacarídeos, quando são constituídos somente de um tipo de monossacarídeo, ou heteropolissacarídeos, quando formado por mais de um tipo de monossacarídeo. As glucanas, por exemplo, contêm exclusivamente moléculas de D-glucopirranose, logo são denominadas homopolissacarídeos [1].

Quando em solução, os polissacarídeos apresentam diferentes conformações da cadeia polimérica, podendo variar de simples-hélice, dupla-hélice, tripla-hélice, novelo aleatório e agregados [13, 14]. A alteração de propriedades do meio (temperatura, força iônica, pH, entre outros) pode promover transições morfológicas na conformação da cadeia polissacarídica.

1.7 BETA GLUCANAS FÚNGICAS

Uma β -D-glucana básica é composta por uma estrutura repetida, com moléculas de D-glicose ligadas em uma cadeia linear por ligações glicosídicas beta (β). Esses polissacarídeos são sintetizados (biossíntese) por plantas, fungos, algumas algas e bactérias principalmente, como materiais estrutural e de armazenagem. O nome β -D glucana é uma generalização, pois a nomenclatura muda dependendo da posição em que as moléculas de glicose unem-se ao longo da cadeia [12].

As β -glucanas são a forma predominante encontrada em fungos. Na parede celular dos fungos, estes polímeros estão normalmente ligados à proteína, lipídeos e outros carboidratos. A função específica da glucana na fisiologia do fungo não está completamente esclarecida; entretanto, considera-se que sua principal função estrutural seja auxiliar na manutenção da rigidez e integridade da parede celular. Tem sido sugerida que a participação deste exopolissacarídeo no metabolismo do fungo, em particular daqueles que degradam a madeira, seria a de atuar como um suporte para adsorção das enzimas excretadas e, finalmente, acredita-se que o exopolissacarídeo protegeria a hifa da desidratação, bem como regularia a concentração de glucose extracelular [1].

Muitos destes polissacarídeos apresentam propriedades reológicas muito aproveitadas na indústria, como é o caso da Escleroglucana, uma β -D-glucana extraída do fungo *Sclerotium glaucum* é usado na indústria como espessante e geleificante [15]. Outra possibilidade de aplicação das β -D-Glucanas é na saúde humana, devido a sua atividade biológica (tabela 2). Entre os polissacarídeos

biologicamente ativos, as D-glucanas do tipo β -(1 \rightarrow 3) e β -(1 \rightarrow 3; 1 \rightarrow 6) revelaram-se compostos potentes, sendo efetivos contra tumores autólogos tanto quanto alogênêicos e singenêicos. Lentinan e esquizofilan, duas glucanas fúngicas β -(1 \rightarrow 3; 1 \rightarrow 6), tornaram-se clinicamente relevantes como imunoadjuvantes na terapia contra o câncer. Estas glucanas, não citotóxicas, supostamente expressam seu efeito antitumor por estimulação do sistema imunológico do hospedeiro [16, 17]. Acredita-se que a ação aconteça, principalmente, pela ativação das células T “helper”, células natural “killer” e macrófagos citotóxicos tanto quanto por um aumento nas células T citotóxicas. Esta atividade antitumoral parece estar relacionada à estrutura química da cadeia principal da glucana na forma de tripla Hélice, à frequência e complexidade das cadeias laterais e à sua massa molecular [18]. Portanto, decifrar as características estruturais destes polímeros é um pré-requisito essencial para entender como as glucanas fúngicas são reconhecidas pelo sistema imune [19].

Tabela 2. Fonte, tipo e bioatividade de algumas Glucanas Fúngicas [19]

<i>Fungo produtor</i>	<i>Referência</i>	<i>tipo</i>	<i>Bioatividade</i>
<i>Pleurotus Tuber regium</i>	Zhang, Cheung, & Zhang, 2001	β -D-glucana	anti-câncer de mama
<i>Schizophyllum comune</i>	Yamamoto, 1981	Glucana , Schizophilan	Antitumor
<i>Auricularia aurícula</i>	Ukai et al., 1983 Ukai et al., 1982	Glucana	Antiglicemia antitumor antiflamatorio
<i>Sclerotinia Sclerotiorum</i>	Palleschi, Bocchiniuso, Coviello, & Alhaique, 2005	Glucana, Scleroglucana	antitumor
<i>Lentinus edodes</i>	Chihara, 1969; Chihara et al., 1970; Hobbs, 2000	Glucana, Lentinan	antitumor antiviral
<i>Inonotus Obliquus</i>	Kim et al., 2005	Glucana	imunomodulador
<i>Agaricus Blazei</i>	Mizuno, 1992; Mizuno, 1998	Glucana	antitumor

1.8 LENTINAN

O lentinan é extraído da parede celular do cogumelo shiitake (*Lentinula edodes*) possui massa molar $\approx (1 \times 10^6 \text{ g.mol}^{-1})$, sendo um homopolissacarídeo formado somente por moléculas de D-glucopiranosose com ligações 1 \rightarrow 3 na cadeia principal e ligações β -1 \rightarrow 6 na cadeia lateral (figura 9). O lentinan é solúvel em água, estável ao calor e a ácidos e bases fracas [20, 21].

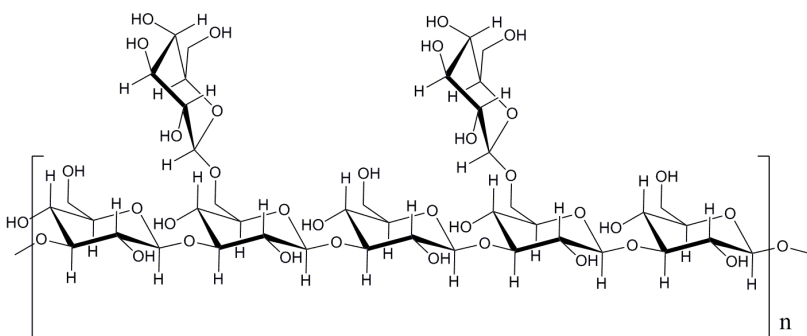


Figura 9. Estrutura química do lentinan.

Os primeiros estudos com o lentinan encontrados na literatura foram feitos por Chihara e colaboradores na década de 70 [22]. Eles extraíram o lentinan de cogumelos comestíveis, e estudaram a bioatividade do mesmo sobre o tumor Sarcoma-180 em ratos [23].

Yap e colaboradores desenvolveram mais tarde, em 2000, outro método de extração do lentinan, mais econômico e eficiente que o método proposto por Chihara na década de 70 [20]. A metodologia desenvolvida por Chihara emprega a extração com água quente (100° C) e sucessivas precipitações com etanol, surfactante e ácido acético enquanto que a metodologia desenvolvida por Yap consiste na extração com água quente, precipitação com etanol e liofilização da amostra, resultando em uma metodologia de menor custo, simples e rápida.

Bluhm e colaboradores estudaram a conformação do lentinan, utilizando a técnica de Difração de Raios-X, propondo alguns modelos conformacionais como hélice-simples, dupla-hélice e tripla hélice [24].

Zhang e colaboradores confirmaram que o lentinan em solução aquosa encontra-se em uma conformação de tripla hélice, enquanto que em DMSO a conformação é de novelo aleatório [25]. A transição de conformação do lentinan em soluções aquosas de NaOH foi estudada por microscopia de força atômica (AFM), viscosidade, espalhamento de luz e rotação ótica. Os resultados revelaram que o lentinan existe como uma cadeia de tripla hélice a concentrações menores que $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ e com conformação de novelo aleatório em concentrações maiores que $0,08 \text{ mol.L}^{-1}$ de NaOH [26]. A transição hélice-novelo também é alcançada quando uma solução aquosa com lentinan é aquecida por volta de 135°C [27]. A conformação de tripla hélice é restabelecida quando é feita uma simples diálise da solução desnaturada, por 7 dias [28].

Como já mencionado, a bioatividade dos polissacarídeos com propriedades medicinais como lentinan está relacionada intimamente com, a estrutura química e conformação da cadeia. Estudos sobre o efeito da massa molar e conformação mostraram que as frações contendo cadeias de Lentinan maiores são mais bioativas; no que diz respeito a conformação, se observou uma drástica diminuição da bioatividade quando a estrutura de tripla hélice foi perdida [18, 29].

Recentes estudos mostraram que a introdução de grupos sulfatos a molécula do lentinan faz com que esta desenvolva forte atividade antioxidante, além de potencializar ainda mais a atividade antitumoral [29, 30].

1.9 INTERAÇÃO POLÍMERO-SURFACTANTE

O estudo da interação de surfactantes (iônicos e não-iônicos) com polímeros naturais e sintéticos (neutros ou polieletrólitos) solúveis em água é atrativo por contribuir para o desenvolvimento científico e tecnológico, além de mimetizar diversas interações que ocorrem *in vivo*. A interação entre surfactantes e polímeros naturais exerce grande influência nas propriedades reológicas, interfaciais e espectroscópicas dos sistemas onde estão inseridos, alterando as características macroscópicas do sistema e consequentemente refletindo em sua aplicação [31, 32].

Polímeros e surfactantes em solução aquosa podem associar-se formando complexos termodinamicamente estáveis, com propriedades físico-químicas diferentes daquelas observadas em soluções micelares. As forças que controlam as interações de surfactantes com polímeros

são idênticas àquelas envolvidas em outras soluções ou propriedades interfaciais, isto é, as forças atrativas de *van der Waals*, o efeito hidrofóbico, interações ácido-base e interações eletrostáticas. A importância relativa de cada tipo de interação varia com a natureza do polímero e do surfactante, de modo que a forma dos complexos possa ser quase tão variada quanto os tipos de materiais disponíveis para o estudo [33].

As interações entre polissacarídeos e surfactantes são dependentes das características moleculares do polímero e estas interações podem influenciar em propriedades do sistema como a tensão superficial, propriedades óticas, viscosidade e outros parâmetros reológicos; como exemplo, os surfactantes podem operar como reguladores reológicos de hidrogéis de polissacarídeos, ajustando as propriedades viscoelásticas do sistema e assim obtendo um produto final com as características desejadas. Dessa forma é possível notar que a combinação de informações macroscópicas e moleculares propicia uma visão mais clara do processo geral de interação [34].

Os estudos de complexos formados por polímero-surfactante mostram que os surfactantes interagem cooperativamente com o polímero a partir da concentração de *agregação crítica, cac*, formando agregados micelares ao longo do polímero (figura 10). Os valores da *cac* são menores do que a concentração micelar crítica (*cmc*) do surfactante. O valor da *cac* depende de forças eletrostáticas, das características estruturais dos grupos carregados e outros fatores como a flexibilidade da cadeia do polímero, da força iônica do meio e dos tipos de contra-íons. A interação polímero-surfactante finaliza ao chegar numa determinada concentração denominada *ponto de saturação do polímero (psp)*, sendo tal concentração diretamente proporcional à concentração do polímero. Em concentrações maiores que o *psp*, ocorre a formação de micelas regulares do surfactante em equilíbrio com os complexos polímero-surfactante, como mostra a Figura 10 [2, 4].

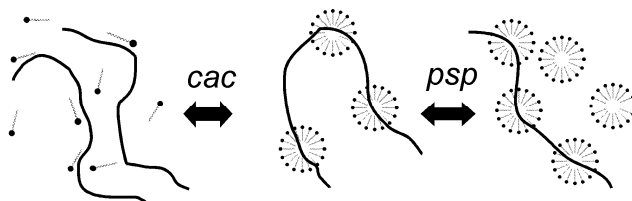


Figura 10. Etapas das associações polímero neutro-surfactante.

1.10 DEFINIÇÕES DAS TÉCNICAS

1.10.1 Espectroscopia de infravermelho

A espectroscopia estuda a interação da radiação eletromagnética com a matéria, sendo um dos seus principais objetivos o estudo dos níveis de energia de átomos ou moléculas. Normalmente, as transições eletrônicas são situadas na região do ultravioleta ou visível, as vibracionais na região do infravermelho e as rotacionais na região de microondas e, em casos particulares, também na região do infravermelho longínquo.

A condição para que ocorra absorção da radiação infravermelha (IV) é que haja variação do momento de dipolo elétrico da molécula como consequência de seu movimento vibracional ou rotacional (o momento de dipolo é determinado pela magnitude da diferença de carga e a distância entre dois centros de carga). Somente nessas circunstâncias, o campo elétrico alternante da radiação incidente interage com a molécula, originando os espectros. De outra forma, pode-se dizer que o espectro de absorção no IV tem origem quando a radiação eletromagnética incidente tem uma componente com frequência correspondente a uma transição entre dois níveis vibracionais.

A vibração dos átomos no interior de uma molécula apresenta energia coerente com a região do espectro eletromagnético correspondente ao IV 100 a 10000 cm^{-1} . Porém a região mais utilizada pelos químicos vai de (500 cm^{-1} a 4000 cm^{-1}).

O espectro de IV de um composto químico é considerado uma de suas propriedades físico-químicas mais características e, por conta disto, a espectroscopia na região do infravermelho tem extensa aplicação na identificação dos compostos [35].

Para a caracterização de polissacarídeos, a técnica de IV torna-se muito importante, pois se pode através dela determinar e classificar algumas bandas relativas a vibrações características dos grupos funcionais presentes na estrutura do polissacarídeo[13, 36, 37]. A figura 11 mostra um exemplo de um espectro de IV de uma β -glucana fúngica .

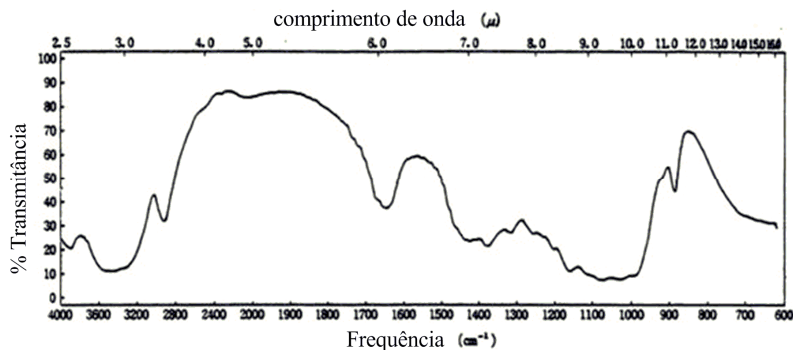


Figura 11. Espectro de infravermelho obtido do Polissacarídeo Curdlan uma (β -1 \rightarrow 3) Glucana em pastilhas de KBr [38].

1.10.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN de ^{13}C)

A análise de RMN de carbono (RMN de ^{13}C) é uma poderosa ferramenta na caracterização de polissacarídeos, fornecendo informações sobre a configuração anomérica, ramificações na cadeia, monômero e sequência [35].

A figura 12 é um bom exemplo de um espectro de RMN de ^{13}C de um polissacarídeo. Os sinais do carbono anomérico (C1) aparecem na faixa de 100-104 ppm dependendo do tipo de ligação glicosídica (α ou β) e os sinais C2,C3,C4,C5 e C6 relativos ao anel glicosídico ficam na região de 60-80 ppm [39].

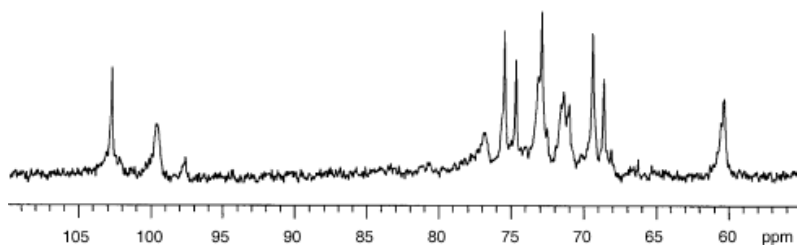


Figura 12. Espectro RMN de ^{13}C de uma β -D-glucana extraída do Fungo *agaricus Blazei* em D_2O [39].

O espectro de RMN de ^1H fornece poucas informações estruturais, devido à dificuldade de separação dos sinais de hidrogênio obtidos para moléculas de polissacarídeos.

1.10.3 Espalhamento de Luz Estático (SLS)

A teoria do espalhamento de luz foi inicialmente proposta em 1871, quando Lord Rayleigh aplicou a teoria eletromagnética clássica para explicar o fenômeno de espalhamento de luz por moléculas de gases [40].

Quando uma onda eletromagnética incide sobre uma partícula, induz nela a formação de dipolos oscilantes. Como uma carga acelerada emite radiação eletromagnética, a partícula passa a funcionar como uma fonte secundária para a emissão de radiação no mesmo comprimento de onda da luz incidente (espalhamento elástico) [41, 42].

O espalhamento de luz estático é um dos métodos mais utilizados para a caracterização de polímeros. Sendo conhecido o incremento do índice de refração (dn/dc) do sistema polímero-solvente, um único experimento pode fornecer a massa molar ponderal média (M_w) e o segundo coeficiente virial (A_2) da equação de van't Hoff. Valores de A_2 positivos indicam boa interação polímero-solvente e valores negativos indicam que as interações polímero-polímero são mais fortes do que as interações polímero-solvente. Se o raio do novelo polimérico for maior que $\lambda/20$, onde λ é o comprimento de onda da luz incidente, é possível obter-se uma medida do tamanho da cadeia, isto é, o raio de giro (R_g). Esses três parâmetros fundamentais da cadeia cuja medida concomitante não é possível com qualquer outro método de caracterização, descrevem a cadeia em detalhes. A expansão do novelo polimérico e as propriedades termodinâmicas da solução de polímero dependem das interações polímero-solvente; desta maneira o segundo coeficiente virial e o raio de giro são dependentes do solvente.

Os parâmetros M_w , A_2 e R_g são propriedades estáticas da macromolécula solvatada, ou seja, não dependem da dinâmica browniana da cadeia resultante das forças de fricção entre segmentos da cadeia e solvente, isto é, da difusibilidade das cadeias no solvente.

Durante medidas de espalhamento de luz é essencial que as amostras estejam totalmente livres de poeira, garantindo assim que toda luz espalhada seja proveniente das moléculas em solução e não de corpos estranhos, tornando os resultados falsos.

A teoria do espalhamento de luz por líquidos puros e soluções de macromoléculas é usualmente chamada de teoria das flutuações. De acordo com esta teoria, a luz espalhada surge da flutuação da polarizabilidade do meio espalhante. Em fluidos simples, pequenas flutuações na polarizabilidade surgem da flutuação na pressão ou temperatura e o espalhamento é geralmente pequeno. Para soluções poliméricas o principal efeito causador é a flutuação na concentração. Desde que, para a avaliação do excesso de intensidade espalhada, a intensidade de espalhamento do solvente seja subtraída, as contribuições da pressão e da temperatura também são essencialmente eliminadas [43].

No espalhamento de luz estático considera-se apenas a intensidade média da luz espalhada em uma dada direção, sem levar em conta as flutuações ou distribuições de frequência da luz. Nos experimentos de espalhamento de luz estático a intensidade da luz espalhada (I_θ) é medida em diferentes ângulos θ . Se os centros de espalhamento são pequenos, como moléculas gasosas, comparados com o comprimento de onda da radiação (dimensões menores que $\lambda/20$), a razão entre a luz incidente e a luz espalhada é conhecida como a razão de Rayleigh segundo a equação[40, 44]:

$$R_\theta = \frac{I_\theta}{I_0} \cdot r^2 \quad (1)$$

onde R_θ é a razão de Rayleigh, I_0 é a luz incidente, r é a distancia entre a partícula e o detector e θ é o ângulo entre a direção da luz incidente e da luz espalhada.

Para sistemas diluídos, a razão de Rayleigh pode ser relacionada como valor de massa molar (M_w) e a concentração (c) pela relação:

$$\frac{Kc}{\Delta R_\theta} = \frac{1}{M_w} \quad (2)$$

onde ΔR_θ é a diferença entre as razões de Rayleigh da solução e do solvente puro e K é a constante ótica e é expressa por:

$$K = \frac{4\pi^2 n^2 \left(\frac{dn}{dc} \right)^2}{N_A \lambda^4} \quad (3)$$

onde n é o índice de refração do solvente, dn/dc é o incremento do índice de refração com a concentração do soluto, N_A é a Constante de Avogadro e λ é o comprimento de onda.

A razão de Rayleigh depende da polarizabilidade da macromolécula, que por sua vez é função do incremento do índice de refração, (dn/dc) . Para determinar este parâmetro é utilizado um refratômetro diferencial, que tem um feixe de luz monocromática que atravessa uma célula que possui dois compartimentos, um dos compartimentos contém o solvente (referência) e o outro contém o soluto. A variação do índice de refração em função da concentração é dada pela Equação 4:

$$\frac{\Delta n}{c} = \left(\frac{dn}{dc} \right) + \alpha_1 c + \dots \quad (4)$$

onde, α é a constante de proporcionalidade ou polarizabilidade, colocando-se em gráfico os valores de $\Delta n/c$ versus c e extrapolando-se á concentração zero, obtém-se o incremento do índice de refração.

A Equação 2 só é valida para soluções com concentrações bem diluídas, onde não existam interações intermoleculares, em concentrações finitas, existem interações intermoleculares que devem ser levadas em consideração, o qual considera-se que as flutuações na polarizabilidade das moléculas dependem do potencial químico, e portanto podem ser relacionadas à pressão osmótica. Desta forma a Eq. 2 pode ser expressa pela expansão virial:

$$\frac{Kc}{\Delta R_\theta} = \frac{1}{M_w} + 2A_2c + 3A_3c^2 + \dots \quad (5)$$

onde, A_2 e A_3 são o segundo e o terceiro coeficiente virial, respectivamente. O terceiro coeficiente virial na maioria dos casos tem valores muito pequenos e são desprezados.

Para macromoléculas as quais o tamanho do novelo é maior do que $\lambda/20$, a luz espalhada varia com o ângulo de observação, isso porque o espalhamento poderá ocorrer a partir de vários centros da mesma partícula. Considerando essas diferenças de espalhamento é necessário introduzir um fator de espalhamento ou fator de forma, $P(\theta)$, aos cálculos, assim a Eq. 5 fica:

$$\frac{Kc}{\Delta R_\theta} = \frac{1}{P(\theta)} \left(\frac{1}{M_w} + 2A_2c + 3A_3c^2 + \dots \right) \quad (6)$$

Sendo que a equação para o fator de forma é:

$$P(\theta) = 1 - \frac{1}{3} \left(\frac{4\pi n}{\lambda} \right)^2 R_g \text{sen}^2 \left(\frac{\theta}{2} \right) \quad (7)$$

onde, R_g é o raio de giração da partícula, o fator de forma pode ser escrito em função do vetor de onda do espalhamento q :

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda} \text{sen} \left(\frac{\theta}{2} \right) \quad (8)$$

Reescrevendo a Eq. 7,

$$\frac{1}{P(\theta)} = 1 + \frac{1}{3} R_g^2 q^2 \quad (9)$$

Nesta dedução, a expressão fator de forma é independente da forma da partícula, e pode ser aplicado contanto que $R_g^2 q^2 < 1$, isto é, para um pequeno q , ou equivalentemente, um pequeno θ .

Incorporando as correlações impostas pelo fator de espalhamento na Equação 5, chega-se à equação conhecida como Equação de Zimm [40, 43]:

$$\frac{Kc}{\Delta R_{\theta}} = \left(1 + \frac{1}{3} R g^2 q^2\right) \left(\frac{1}{M_w} + 2A_2 c \dots\right) \quad (10)$$

O valor da massa molar ponderal média, do segundo coeficiente virial e do raio de giro podem ser obtidos pelo método de Zimm. Este método é aplicado traçando-se um gráfico Kc/R_{θ} versus $\sin^2(\theta/2) + kc$, onde k é uma constante arbitrária utilizada para garantir a separação gráfica das curvas de espalhamento individuais, obtidas a diferentes concentrações. Extrapolando-se os dados para $\theta=0^{\circ}$ (onde não há decréscimo na intensidade da luz espalhada) e $c=0$ obtém-se o inverso da massa molar ponderal média como resultado da intersecção no eixo das coordenadas. Das inclinações das retas obtidas para $\theta=0^{\circ}$ e $c=0$, obtém-se o raio de giração e o segundo coeficiente virial, respectivamente [9].

Um gráfico obtido com base na equação de Zimm pode ser visto na Figura 13.

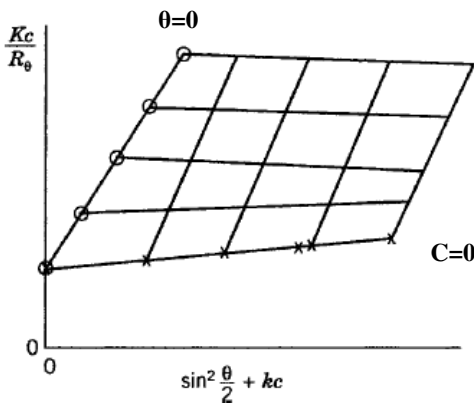


Figura 13. Típico gráfico de Zimm para soluções poliméricas.

1.9.4 Espalhamento de luz dinâmico (DLS)

O DLS é também conhecido como espectroscopia de correlação de fótons, sendo esta utilizada para avaliar o tamanho de partículas.

Partículas suspensas em um líquido se movem constantemente devido ao movimento browniano. Uma característica importante do movimento browniano para o DLS é que partículas pequenas movem-se mais rapidamente que partículas grandes, portanto, possuem maior coeficiente de difusão (D_0).

O DLS mede o movimento browniano e o relaciona com o tamanho das partículas. Isso é realizado através da incidência de um laser sobre as partículas e analisando a intensidade de flutuação da luz espalhada. Devido ao movimento browniano, a intensidade da luz espalhada por um conjunto de partículas sofre flutuações ao longo do tempo. A relação entre a intensidade I de luz espalhada no ângulo q no tempo t e no tempo $(t+\tau)$ é expressa em uma curva de autocorrelação g_2 , tal como expressa na equação 11 [44]:

$$g_2(q, \tau) = \frac{\langle I(q, t)I(q, t + \tau) \rangle}{\langle I(q, t)^2 \rangle} \quad (11)$$

As flutuações de espalhamento estão relacionadas com o coeficiente de difusão aparente e o vetor de onda do espalhamento, segundo a Equação:

$$\Gamma = D \cdot q^2 \quad (12)$$

onde, Γ é a constante de correlação ou de relaxação, D é o coeficiente de difusão aparente e q é o vetor de onda do espalhamento.

Dentro do regime diluído, D varia linearmente com a concentração da amostra (c), ou seja,

$$D = D_0(1 + k_D c + \dots) \quad (13)$$

onde D_0 é o coeficiente de difusão à diluição infinita, k_D é o coeficiente “virial” hidrodinâmico relacionado com as interações soluto-soluto e de soluto-solvente. A Equação de Stokes-Einstein (Eq.14) relaciona o coeficiente de difusão à diluição infinita e o raio hidrodinâmico (R_H):

$$R_H = \frac{k_B T}{6\pi\eta D_0} \quad (14)$$

onde, k_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura termodinâmica e η é a viscosidade do solvente.

Através de um ajuste exponencial da curva de correlação é possível se determinar a frequência de relaxação Γ aparente para cada ângulo de espalhamento. O coeficiente angular da curva $\Gamma \times q^2$ é o coeficiente de difusão real da amostra para aquela concentração. Fazendo-se o mesmo experimento em diferentes concentrações e usando a equação 13, chega-se a D_0 . Finalmente, substituindo D_0 na equação 14 encontra-se o raio hidrodinâmico das partículas [40, 45].

Como explicado anteriormente, a principal diferença entre as medidas de espalhamento de luz estático (SLS) e o Espalhamento de luz dinâmico (DLS) é que no caso do espalhamento estático (SLS), mede-se a **intensidade média** da luz espalhada por um conjunto de partículas, enquanto que no Espalhamento de luz dinâmico medem-se **flutuações da intensidade** do espalhamento em função do tempo.

1.10.5 Espalhamento de Raios-X a baixos ângulos (SAXS)

A técnica de Espalhamento de raios-X a baixos ângulos ou (Small Angle X-Ray Scattering – SAXS) é bem eficaz no estudo de estruturas em nano-escala e flutuações na matéria mole (*A matéria mole é normalmente definida como os subtipos de estados físicos facilmente deformáveis por flutuações térmicas* [46]). Como outros métodos complementares de espalhamento usando a luz visível ou nêutrons, o SAXS também é uma técnica de resultado rápido, que não destrói a amostra e não precisa de tratamento prévio, além de necessitar de

quantidades muito pequenas para que seja efetuada a análise. A técnica de SAXS é utilizada para investigar detalhes estruturais de sistemas com comprimentos de correlação na região entre 0,5 e 50 nm. O princípio teórico da técnica de SAXS é similar ao das técnicas de SLS; entretanto, como o comprimento de onda da luz incidente é bem menor, a escala de observação é diferente. A Figura 14 mostra um esquema ilustrativo para um experimento de SAXS.

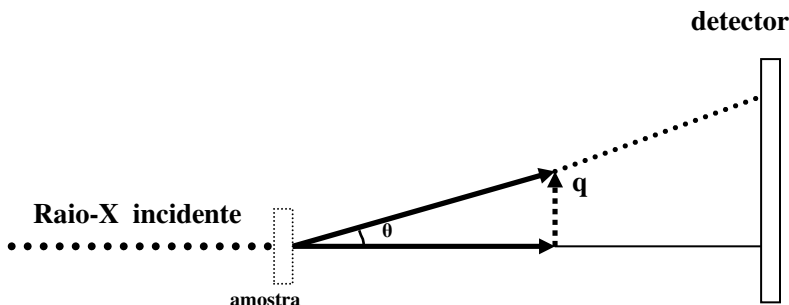


Figura 14. Esquema ilustrativo para um experimento de SAXS.

Em um experimento de SAXS, a amostra é exposta aos raios X e a intensidade de espalhamento, $I(q)$, é anotada como proporcional à média da amplitude do espalhamento para todas as orientações, onde q é o vetor de onda. O módulo do vetor de onda $|\vec{q}|$ depende do comprimento de onda da radiação (λ) e do ângulo de espalhamento (θ), equação 15 [47, 48].

$$|\vec{q}| = \frac{4\pi}{\lambda} \sin \theta \quad (15)$$

O ângulo de espalhamento corresponde ao ângulo formado entre as direções dos feixes incidente e espalhado, Figura 14.

A técnica de SAXS permite obter informações sobre várias características das macromoléculas, como raio de giro, massa molecular, distância máxima e forma da partícula espalhadora[49].

Considerando-se SAXS e SLS, três diferenças fundamentais devem ser explicitadas:

→ A radiação eletromagnética difere no seu comprimento de onda (a luz visível apresenta comprimento de onda entre 370-700 nm enquanto que feixes de raios-X têm comprimento de onda variando entre 0,01 e 0,2 nm);

→ A geometria de espalhamento é diferente (enquanto que em SLS convencional acessam-se ângulos de espalhamento na região entre 20° e 150°, os ângulos acessados nos experimentos de SAXS estão geralmente na região entre 0,5° e 4°);

→ Devido à capacidade de penetração dos raios-X é possível também se fazer SAXS de amostras sólidas, como cristais, pós ou filmes.

1.10.6 Fluorescência

A fluorescência é um processo de fotoluminescência no qual os átomos ou moléculas são excitados por absorção de radiação eletromagnética. Assim, ao retornarem ao estado fundamental, ocorre a liberação de energia através da emissão de radiação. Entre as suas aplicações, a fluorescência tem sido muito utilizada para estudar a interação entre polímeros e polímeros modificados com surfactantes [50-52].

Para avaliar as interações entre polímero-surfactante é necessária a presença de uma sonda fluorescente na solução, quando as moléculas não apresentam fluoróforos. As sondas fluorescentes referem-se a uma variedade de moléculas e íons que, sob apropriada excitação eletromagnética, emitem luz. Na prática, as características da banda de emissão da sonda são exploradas para fins de monitoramento do microambiente de sistemas moleculares organizados e estão atreladas a fatores como polaridade do meio.

Com esta técnica é possível determinar a *cac*, o número de agregação dos sistemas polímero-surfactante, além do monitoramento da polaridade do microambiente no interior dos complexos. O pireno é a sonda fluorescente mais usada para este fim. Dentre as propriedades que tornam o pireno uma sonda atraente está a alta sensibilidade à polaridade dos microambientes [53]. A particularidade é que o espectro de emissão exibe bandas de vibração finas cujas intensidades relativas são sensíveis à polaridade do meio. Enumerando as bandas de vibração de 1 a 5, que são observadas na temperatura ambiente (Figura 15), a banda I₃ em 384,0 nm, mostra pouca sensibilidade aos solventes,

enquanto que a banda I₁ em 372,8 nm, muda a intensidade em função do solvente, aumentando em solventes polares.

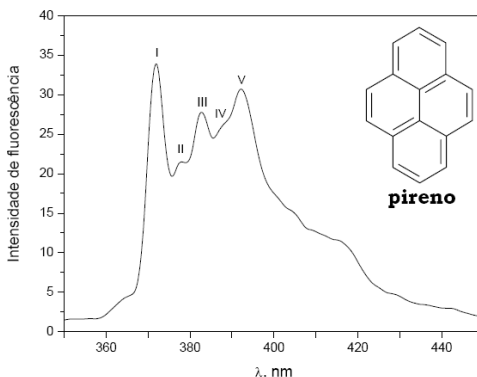


Figura 15. Espectros de emissão de fluorescência do monômero do pireno em etanol [54].

A medida da polaridade relativa é expressa em termos da relação I_1/I_3 e é utilizada como critério para avaliar a micropolaridade do meio e de microambientes de agregados micelares. valores bastante diferentes ocorrem em meios polares, como a água, e apolares, como no interior de uma micela. Os valores dessa razão para solventes polares ficam em torno de 1,8 e 0,6 para hidrocarbonetos. A concentração micelar crítica (*cmc*) e *cac* podem ser obtidas pela mudança da razão I_1/I_3 em função da concentração de surfactante. Assim, no início da formação da micela, a razão I_1/I_3 diminui acentuadamente, o que reflete na solubilização do pireno em um ambiente hidrofóbico. A sensibilidade do pireno com relação à polaridade do meio também possibilita utilizar esta técnica como uma forma de caracterizar as modificações hidrofóbicas realizadas nos polímeros [50, 55, 56].

1.10.7 Tensão Superficial

A orientação molecular é um fenômeno muito importante que acontece na interface líquido-ar, líquido-líquido. Isto depende primariamente das forças intermoleculares, as quais são de tipo de van der Waals, exceto no caso em que estão envolvidos íons. As moléculas no interior do líquido sofrem a ação de atrações iguais em todas as direções, ao passo que aquelas situadas na interface estão submetidas à

ação de forças não balanceadas. Assim, a tensão superficial de um líquido é definida como a força resultante do desequilíbrio das forças de atração na superfície, entre as moléculas do líquido e as do ar, sendo voltadas para o interior da solução e perpendiculares a superfície, figura 16 [57].

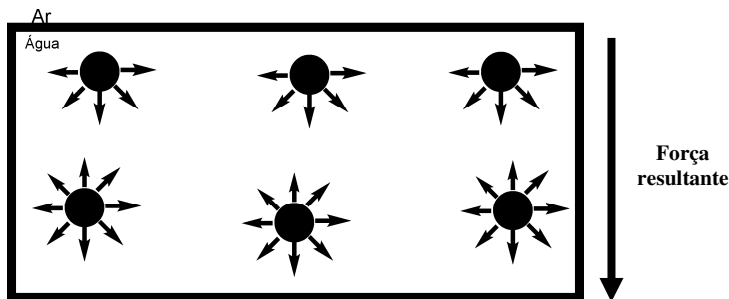


Figura 16. Representação da tensão superficial ar-água.

Rosen define tensão superficial em termos de energia livre (equação 16), sendo a medida da energia livre interfacial por unidade de área da interface limite entre o líquido e o ar[7]. Embora referenciada como energia por unidade de área, a tensão superficial pode ser expressa como força por unidade de comprimento. As unidades típicas são erg/cm^2 ou dyna/cm que são dimensionalmente idênticas, correspondentemente no SI em J/m^2 ou mN/m [7].

$$\left(\frac{\partial G}{\partial \sigma} \right)_{T,p,n} = \gamma \quad (16)$$

Alguns métodos são bastante utilizados na medida de tensão superficial de líquidos, tais como: aumento da capilaridade, peso da gota de um líquido, pressão máxima da bolha, força necessária para desprender um anel da superfície de um líquido, a qual é medida através de uma balança de torção. Esse último, atribuído a du Nouy é amplamente utilizado, é conhecido como método do anel, no qual o equipamento utilizado é um tensiômetro.

A técnica de tensão superficial é amplamente usada para determinar a *cmc* e o comportamento das moléculas de surfactante atuando na interface ar-líquido [58, 59].

Quando um surfactante é adicionado à água, suas moléculas tendem a arranjar-se de modo a minimizar o contato entre os grupos hidrofóbicos e a água: os grupos polares do surfactante ficam na solução aquosa, próximos à superfície, e os grupos apolares ficam na superfície. Isto gera uma diminuição na tensão superficial da água porque diminui o número de moléculas de água na superfície. A diminuição na tensão superficial ocorre até a *cmc*; em concentrações acima desse ponto, a tensão superficial da solução é constante, pois todo surfactante adicionado é destinado à formação de micelas (Figura 17).

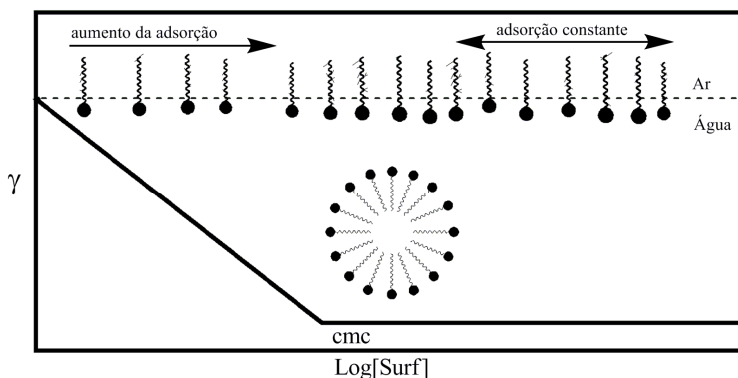


Figura 17. Ilustração de uma curva obtida na titulação tensiométrica de surfactante em água, indicando o processo de micelização.

Além da determinação da *cmc*, a técnica de tensão superficial permite o cálculo da concentração em excesso na superfície, Γ_{max} , e a área mínima por molécula de surfactante, A_{min} , na interface ar/solvente, fazendo-se uso das equações a seguir [4, 5]:

$$\gamma = -\Gamma_{\text{max}} RT \ln c \quad (17)$$

$$A_{\min} = \frac{1}{\Gamma_{\max} N_A} \quad (18)$$

onde, R é a constante dos gases, T é a temperatura, N_A é o Constante de Avogadro, γ é o valor da tensão superficial e C é a concentração de surfactante na solução [60].

2.OBJETIVOS

- Extrair o polissacarídeo lentinan do cogumelo shiitake;
- Caracterizar o lentinan utilizando as técnicas de infravermelho, RMN de ^{13}C ;
- Determinar a massa molar aparente ($M_{w,app}$), raio de giração (R_g) e segundo coeficiente virial (A_2), concentração de sobreposição c^* e raio hidrodinâmico (R_H) do lentinan por espalhamento de luz;
- Estudar a conformação, morfologia do Lentinan em meio aquoso utilizando a técnica de espalhamento de raios-x a baixos ângulos (SAXS);
- Sintetizar um derivado do lentinan através da introdução de grupos dodecanoatos utilizando o ácido dodecanóico;
- Caracterizar o lentinan modificado (LT-Dod) por RMN ^{13}C e Fluorescência;
- Determinar a Massa molar Aparente ($M_{w,app}$), raio de giração (R_g) e segundo coeficiente virial (A_2), concentração de sobreposição c^* e raio hidrodinâmico (R_H) do lentinan modificado (LT-Dod) por Espalhamento de luz;
- Estudar a formação de complexos do Lentinan e Lentinan modificado com surfactantes zwitteriônicos em solução aquosa utilizando as técnicas de fluorescência, tensão superficial e espalhamento de luz estático.

3.PARTE EXPERIMENTAL

3.1 MATERIAIS E REAGENTES

O Lentinan foi extraído do cogumelo Shiitake procedente do Estado de São Paulo . O etanol P.A. utilizado na extração é de procedência da nuclear com 99% de pureza.

A membrana de diálise utilizado na purificação do polissacarídeo é de procedência da *Spectra Por* feita de acetato de Celulose com Massa Molar de corte de 3.500 g.mol^{-1} .

Os reagentes utilizados na reação de esterificação do Lentinan foram o Dimetil Sulfóxido (DMSO), o dicicloexilcarbodiimida (DCC), ácido dodecanóico e o 4-dimetilaminopiridina (DMAP), todos de procedência da Sigma.

O pireno, o *N*-dodecil-*N,N*-dimetil-3-amônio-1-propanossulfonato (SB3-12) e o *N*-tetradecil-*N,N*-dimetil-3-amônio-1-propanossulfonato (SB3-14) , todos com 99% de pureza são de procedência da Sigma.

3.2 EQUIPAMENTOS E MÉTODOS UTILIZADOS

3.2.1 Extração pelo método de Yap

A metodologia inicial empregada na extração do Lentinan foi a desenvolvida por Yap [20], com modificações.

Em um balão de 2L foram refluxados, por 24h, 200g do chapéu de cogumelo shiitake fresco, homogeneizados em um liquidificador com 1000 mL de água destilada. Após o término do refluxo, a solução foi filtrada e concentrada por evaporação da água a um volume de 300 mL. À solução restante adicionou-se igual volume de etanol absoluto, filtrando-se o precipitado gelatinoso formado. O precipitado foi dissolvido em 100 mL de água a 80 °C, sob agitação e filtrado a fim de se retirar matrizes insolúveis. Esse processo de solubilização e precipitação com etanol foi repetido por mais duas vezes. Por fim, a amostra foi dissolvida em solução $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$ de NaOH e dialisada em água por cinco dias utilizando uma membrana de acetato de celulose com Massa Molar de corte (3.500 g.mol^{-1}), em seguida, liofilizada.

Foram obtidos 0,115 g do polissacarídeo, com rendimento de 0,05% em massa com relação ao cogumelo fresco.

3.2.2 Síntese do lentinan (lentinan-Dod) hidrofobicamente modificado.

Foi realizada uma derivatização hidrofóbica, sendo introduzidos 10% de grupamentos dodecila na estrutura do lentinan. A síntese do polímero modificado (LT-Dod) foi realizada dissolvendo-se 100 mg ($8,67 \times 10^{-5}$ mol) de lentinan em 25 mL de DMSO em um balão de fundo redondo de 50 mL que foi devidamente fechado e colocado sob agitação por 12 horas, para completa solubilização do polímero. Após 12 horas adicionaram-se 1 mg de DCC e 1 mg de DMAP. Para finalizar adicionou-se 1,73 mg ($8,67 \times 10^{-6}$ mol) de ácido Dodecanóico e manteve-se a solução sob agitação durante 5 dias a 25°C. Em seguida, a purificação do derivado foi realizada por diálise e o produto liofilizado.

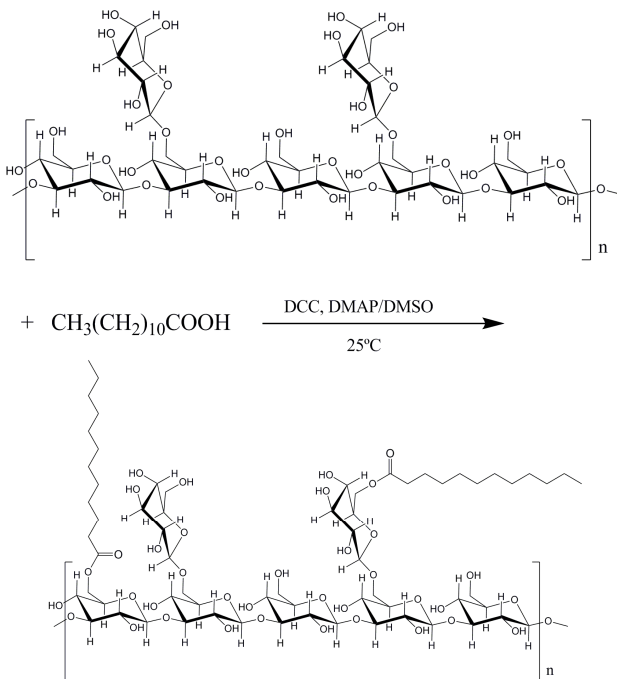


Figura 18.Esquema da síntese do Lentinan Hidrofobicamente modificado (LT-dod) .

3.2.3 Análises de IV

As análises de Infravermelho foram realizadas na Central de Análises do Departamento de Química da UFSC. Os espectros foram feitos em pastilha de KBr, com cerca de 3,0mg de amostra em um espectrofotômetro de infravermelho, Modelo: FTLA 2000, Marca: ABB.

3.2.4 Análises de RMN de ^{13}C

Os espectros de (RMN de ^{13}C) das amostras obtida pelo método de Yap foram realizados em um equipamento Varian, modelo Mercury Plus, 400 MHz, a 25°C, em um tubo de 5mm. O pulso utilizado foi de 45° com um tempo de relaxação de 1,3 s. As amostras foram preparadas com uma concentração de 12 mg/mL, em DMSO-d₆. A análise quantitativa dos espectros de RMN de ^{13}C foi realizada alterando-se o pulso para 90° e o tempo de relaxação para 10 s. Nessas condições, os núcleos de ^{13}C , cujas constantes de tempo de relaxação variam em uma ampla faixa, sofrem o mesmo grau de relaxação e a integração das áreas dos sinais correspondem ao número correto de átomos de carbono.

3.2.5 Espalhamento de luz estático

As medidas de espalhamento de luz estático foram realizadas no espectrômetro de espalhamento de luz BI-MwA da Brookhaven Instruments Corporation, com laser de 620,0 nm. Foram analisados nos ângulos 35, 50, 75, 90, 105, 135 e 145°.

O incremento do índice de refração (dn/dc) foi determinado em um refratômetro diferencial BI-DNDC da Brookhaven Instruments Corporation, com um *software* DNDCW WindowsTM, com laser de 620,0 nm.

3.2.6 Espalhamento de Luz dinâmico

As medidas de espalhamento de luz dinâmico foram feitas em Porto Alegre no Laboratório de Instrumentação e Dinâmica Molecular (LINDIM), foram analisadas em um ângulo fixo de 90°, no espectrômetro de espalhamento de luz Brookhaven Instruments

Corporation (goniômetro BI-200, correlator digital AT BI-9000), com laser de He-Ne (comprimento de onda de 632,8 nm) como fonte de radiação.

3.2.7 Espalhamento de raios-x a baixos ângulos (SAXS)

As análises foram realizadas na linha de SAXS do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), Campinas-SP, Brasil. As medidas foram conduzidas a 25 °C utilizando um banho termostatizado para controle de temperatura. A distância da amostra ao detector foi 1,47 m, com radiação com comprimento de onda de $\lambda=1,488 \text{ \AA}$.

Foram feitas várias soluções 10 mL cada mantendo-se a concentração do lentinan constante a 1 mg.mL^{-1} variando-se a concentração de NaOH na solução entre 0 mmol.L^{-1} e 100 mmol.L^{-1} .

3.2.8 Tensiometria

As medidas de tensão superficial foram feitas utilizando-se um tensiômetro da KRUSS GMBH, modelo K 8, com escala de divisão de 0,1 mN/m equipado com um anel de Pt-Ir-20 e frasco termostatizado para conter a amostra. Foram usados volumes de 10,0 mL de solução do correspondente surfactante ou misturas, previamente preparada para cada medida. A temperatura foi mantida a $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ através de um termostato.

3.2.9 Fluorescência

As medidas de fluorescência do estado estacionário do pireno foram executadas em água destilada a $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Uma solução de pireno $\approx 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ era preparada a partir de uma solução estoque $10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ de pireno (Aldrich 99%) em etanol. As soluções de SB3-12, SB3-14 foram preparadas a partir da solução contendo pireno, assim como as soluções de Lentinan e LT-Dod. Para certificar-se de que os dados experimentais foram determinados em uma situação de equilíbrio do sistema, todas as soluções estoques de Lentinan foram preparadas rotineiramente com agitação magnética suave por 12 horas. Então, as soluções estoques de SB3-12 e SB3-14 foram preparadas na solução contendo pireno e Lentinan ou LT-Dod e deixadas atingir o equilíbrio pelo menos por 4 horas antes de registrar o espectro de emissão.

Os espectros de fluorescência do estado estacionário do pireno foram determinados em um espectrofluorímetro Hitachi F-4500 equipado com uma cela de quartzo de 1,0 cm termostatizada a $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ sob agitação magnética. As fendas de excitação e emissão do monocromador foram ajustadas para 2,5 nm. As amostras foram excitadas em 336 nm e os espectros de emissão foram corridos de 360,0 a 500,0 nm. Tipicamente, os espectros de fluorescência foram realizados após a adição de volumes conhecidos da solução estoque de surfactante. Para cada leitura, a concentração foi corrigida devido à diluição ocorrida na cela que previamente continha 2,0 mL de solução contendo igual concentração de pireno. A razão I_1/I_3 foi estimada analisando a relação da intensidade máxima da banda em 372,8 nm (I_1) e 384,0 nm (I_3).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 EXTRAÇÃO DO LENTINAN

O método de extração utilizado neste trabalho foi desenvolvido por *Yap* [20] e baseia-se na diferença de solubilidade dos polissacarídeos extraídos em fase aquosa, ou seja, fracionamento feito por precipitação seletiva, neste caso usando etanol. A extração feita com água a 100°C tem como finalidade separar polissacarídeos solúveis em água. Neste caso o lentinan. A diálise tem por finalidade separar o produto de impurezas como o NaOH utilizado e eventuais contaminantes de pequena massa molar.

Ao final do processo, a liofilização separa o lentinan da água obtendo-se um sólido branco e de textura esponjosa.

Testes de solubilidade mostraram que o lentinan é solúvel em água, solução básica de NaOH em KOH e em DMSO. Quando em o lentinan água forma uma solução bastante viscosa em concentrações acima de 5 mg.mL⁻¹, condizendo com dados reportados na literatura, característicos de Glucanas com alto massa molar. Quando aquecido e posteriormente resfriado a temperaturas próximas a 10°C forma um gel fraco.

4.2 SÍNTESE DO LENTINAN MODIFICADO (LT-Dod).

As hidroxilas presentes na estrutura do lentinan permitem a derivatização por um grande número de grupos funcionais. Entre as possibilidades de derivatização existentes na literatura, a esterificação do lentinan com ácidos carboxílicos é uma das maneiras simples e econômica para introduzir os grupos hidrofóbicos na estrutura do polissacarídeo. Os grupos dodecanoato foram introduzidos a fim de avaliar a interação do lentinan com surfactantes na formação de complexos polímero-surfactante e na viabilidade de utilizá-lo futuramente na estabilização de emulsões e formulações de nanopartículas.

Foram realizadas três sínteses: nas duas primeiras foram introduzidos 30% e 20% de grupos dodecanoato na estrutura do lentinan, porém os produtos obtidos mostraram-se insolúveis em água, inviabilizando sua utilização. Na terceira síntese foi realizada a introdução de 10% de grupos dodecanoato na estrutura do lentinan, o produto obtido apresentou boa solubilidade em água, o que nos levou a conduzir os estudos utilizando esse produto com 10% de grupos

dodecanoato, com código LT-Dod. O método de Steglich [61] de esterificação, que foi utilizado na modificação do lentinan, está representado na Figura 19.

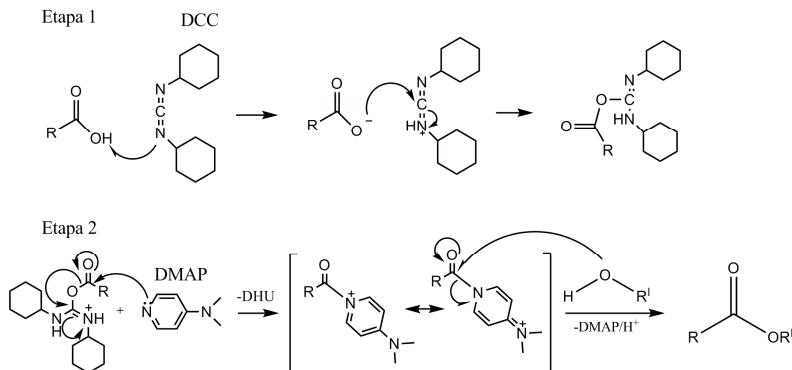


Figura 19. Mecanismo genérico da reação de esterificação do lentinan.

Na primeira etapa o ácido carboxílico, neste caso o ácido dodecanóico reage com DCC para formar um intermediário, *O*-acil isourea, com reatividade similar à do anidrido do ácido dodecanóico e, portanto, mais reativo que o reagente de partida. Na segunda etapa o catalisador DMAP, como é um nucleófilo mais forte que o álcool, reage com a *O*-acil isourea eliminando a diciclohexilureia (DHU) formando um novo intermediário que não forma produtos secundários, porém reage muito rápido com álcoois. O DMAP, nesse caso atua como um reagente de transferência de dodecila, e é nesta etapa que as hidroxilas do lentinan atacam o intermediário para a formação do éster [62].

4.3 CARACTERIZAÇÃO DO LENTINAN E LENTINAN MODIFICADO (LT-Dod)

4.3.1 Espectrofotometria – de IV para o lentinan

O infravermelho de polissacarídeos mesmo fornecendo espectros complexos é uma ferramenta valiosa na caracterização de Glucans como o Lentinan. Através dele é possível classificar algumas bandas relativas a vibrações características de grupos funcionais presentes e a configuração das ligações glicosídicas. A Figura e Tabela

seguir mostram o espectro de infravermelho obtido para o Lentinan e as suas principais bandas de absorção no IV respectivamente.

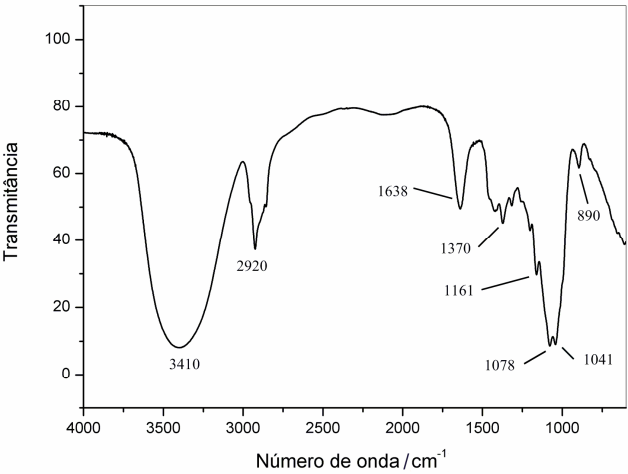


Figura 20. Espectro de IV do Lentinan feitos em pastilhas de KBr.

Tabela 3. Principais bandas de absorção no infravermelho observadas para o lentinan.

Numero de onda (cm ⁻¹)	Tipo de Observação
3410	Deformação axial O-H
1638	deformação angular O-H
2920	estiramento assimétrico (CH ₂)
1370	deformação angular (CH ₂)
1161	Função éter (C-O-C)
890	Deformação angular (C-H)-β
1078	Deformação axial (C-H) 1→6
1041	Deformação axial (C-H) 1→3

Como pode ser observada a presença de uma banda intensa em 3410 cm^{-1} é resultado da deformação axial da ligação O-H, tal intensidade evidencia a presença de ligações de hidrogênio intermolecular. A banda presente em 1638 cm^{-1} está relacionada com a deformação angular de hidroxilas de alcoóis primários e secundários. As bandas características da função éter (C-O-C) presentes no Lentinan aparecem em 1161 cm^{-1} .

A banda de estiramento assimétrico do grupo metileno (CH_2) aparece em 2920 cm^{-1} enquanto que a banda de deformação angular em 1370 cm^{-1} .

Os sinais de extrema importância para a caracterização da estrutura do Lentinan, ou de qualquer outra glucana, são aquelas referentes à deformação angular e axial da ligação C-H do carbono anomérico. Em 890 cm^{-1} pode-se observar uma pequena banda causada pela deformação angular dessa ligação, esse valor encontrado é característico de ligações β -glicosídicas, indo ao encontro com o valor obtido por *Chen* [63] em seus estudos de extração e caracterização de outra β -glucana fúngica. Finalmente, os sinais referentes à deformação axial encontram-se em 1041 e 1078 cm^{-1} , característicos de ligação $1\rightarrow6$ e ligação $1\rightarrow3$, respectivamente, concordando com o valores obtidos por *Dias* [12].

4.3.2 Espectrometria de RMN de ^{13}C para o lentinan

A figura 21 mostra o espectro de RMN de ^{13}C obtido para o lentinan em DMSO d_6 . Como pode-se observar tem-se apenas um sinal para o carbono anomérico C-1, em $\delta\ 103,9$, característico de Glucanas com configuração β . Enquanto que as glucanas com configuração α tem o sinal do carbono anomérico em $\delta\ 101,0$ [64].

Para o C-2, têm-se duas possibilidades de sinais, quando esse é vizinho de moléculas de glicose ligadas em posição $1\rightarrow3$, o sinal aparece $\delta\ 73,5$. Entretanto quando C-2 é vizinho de moléculas de glicose ligadas $1\rightarrow6$, o deslocamento é maior, $\delta\ 74,064$.

Os sinais por volta de $\delta\ 87$ são referentes aos carbonos C-3 do monômero de glicose quando ligados em posição $1\rightarrow3$. Os átomos C-3 não substituídos, encontram-se em $\delta\ 77,48$. Através da comparação entre a intensidade desses dois sinais pode-se confirmar a cadeia principal como sendo $1\rightarrow3$.

Os átomos de C-4 encontram-se em δ 69,13 e o sinal dos C-5 fica em δ 76,3.

O carbono C-6, substituído, apresenta um sinal em δ 70,6 confirmando a presença de ligações glicosídicas 1 \rightarrow 6. O outro carbono C-6 sem ramificações, aparece em δ 61,58.

O grau de ramificação da molécula foi determinado através da integração das áreas dos sinais obtidos. Relacionando-se a área do sinal em δ 103,9, referente a todos os átomos C-1 da molécula, com a área do sinal em δ 87, referente a todos os C-3 substituídos obtêm-se o grau de ramificação da molécula em posições (1 \rightarrow 3). Já a relação entre o sinal em δ 103 (C-1) com o sinal em δ 70,6 referente aos C-6 substituídos obtêm-se o grau de ramificação da molécula em posições (1 \rightarrow 6). Para os C-1, a área obtida foi igual a 7,00, estabelecida como sendo o sinal de referência, enquanto que para os C-3 substituídos foi de 5,04 e para os C-6 substituídos a área encontrada através da integração foi de 1,5. Essa relação confirma a existência de dois monômeros de glicose ligados 1 \rightarrow 6 a cada cinco monômeros de glicose ligados 1 \rightarrow 3.

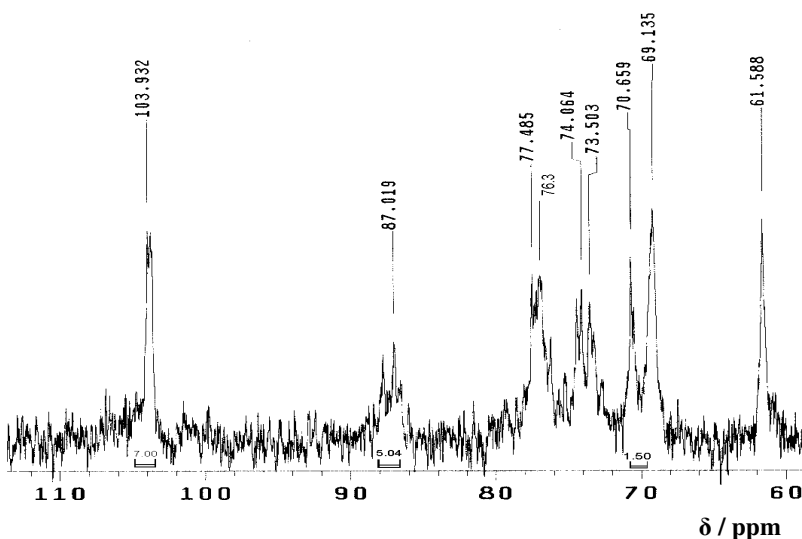


Figura 21. Espectro de RMN de ^{13}C do lentinan em DMSO- d_6 .

A Tabela 4 apresenta os deslocamentos químicos dos sinais de RMN de ^{13}C obtidos para o lentinan.

Tabela 4. Deslocamento químico dos sinais de RMN de ^{13}C para o lentinan.

Deslocamento químico (ppm)	Tipo de Observação
103,9	C-1 β -Glucanas
73,5	C-2 vizinho 1 \rightarrow 3
74,06	C-2 vizinho 1 \rightarrow 6
87	C-3 ligados em posição 1 \rightarrow 3
77,48	C-3 não substituídos
69,13	átomos de C-4
76,3	átomos de C-5
70,6	C-6 ligados em posição 1 \rightarrow 6
61,5	C-6 sem ramificações

4.3.3 Espectrometria de RMN de ^{13}C para o LT-Dod

A síntese do polímero LT-Dod foi confirmada por RMN de ^{13}C . O espectro do Lentinan modificado (Figura 22) foi comparado com o do polímero não modificado (Figura 21). Observa-se claramente que o espectro referente ao polímero LT-Dod apresenta os sinais característicos dos grupos dodecanoatos introduzidos.

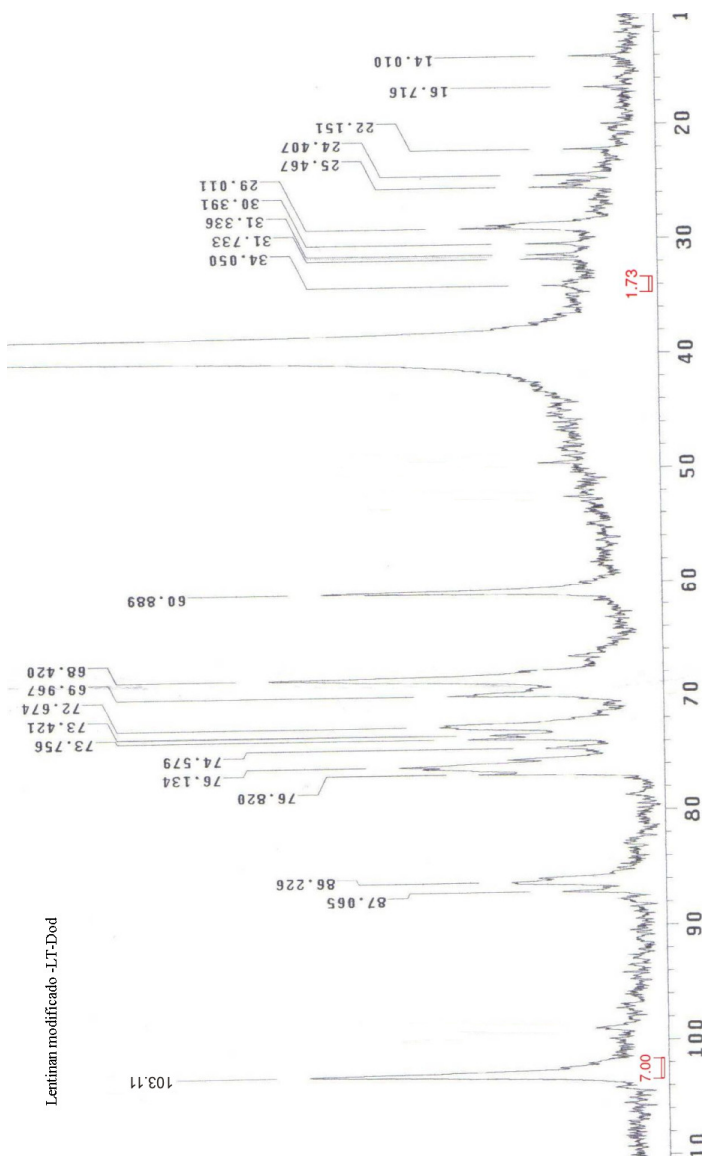


Figura 22. Espectro de RMN de ^{13}C do lentinan modificado (LT-Dod) em DMSO-d_6 .

Na figura 22 sinal relativo ao C-2 do espectro de RMN aparece em δ 34,05, em δ 24,04 observa-se C-3. O sinal de média intensidade presente em δ 29,011 deve-se aos carbonos C-4~C-9. Em δ 31,7 observa-se o sinal do C-10 da cadeia do ácido dodecanóico. Em δ 14,010 e δ 22,15 temos dois pequenos sinais relativos ao C-11 e C-12, respectivamente. O sinal relativo a carbonila em δ 178 não foi observado. Tal ausência deve-se a diferença do tempo de relaxação entre o grupamento carbonila do éster e os demais carbonos no espectro de RMN, dificultando a sua detecção [35]. A Figura 23 mostra um esquema com os sinais de cada carbono presente no RMN do ácido dodecanóico.

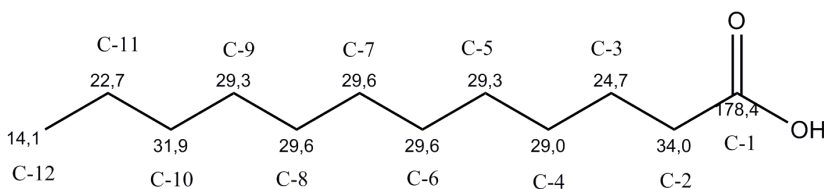


Figura 23. Esquema com o deslocamento químico teórico em ppm para cada carbono presente no ácido dodecanóico.

Para obter-se o grau de substituição do polímero modificado, relacionou-se a área do sinal em δ 103,11 referentes aos C-1 da glicopirranose, com a área do sinal em δ 34,050, referentes a todos os carbonos C-2 da molécula de ácido dodecanóico. A área obtida para o C-1 foi igual a 7, estabelecida como referência obtendo o valor de 1,73 para a área do C-2. Como sabe-se que existe somente um carbono C-2 com deslocamento químico de δ 34 para cada molécula de ácido dodecanóico, conclui-se pela área obtida de C-2 que existam em média duas moléculas ácido dodecanóico para cada monômero de lentinan. Cada monômero de lentinan possui vinte e uma hidroxilas que podem sofrer esterificação, sendo assim a cada vinte e uma dessas hidroxilas, duas foram esterificadas, introduzindo-se o grupo dodecanoato, ou seja, em média 10% de substituição. Lembrando-se que na molécula de lentinan existem hidroxilas primárias e secundárias, a substituição ocorrerá preferencialmente nas hidroxilas primárias que são mais reativas que as hidroxilas secundárias.

4.3.4 Fluorescência do Pireno para os sistemas LT e LT-Dod.

Utilizou-se a fluorescência como uma técnica adicional para confirmar a modificação hidrofóbica do polímero LT-Dod. O perfil da razão I_1/I_3 dos espectros de fluorescência do pireno *versus* a concentração dos polímeros LT e LT-Dod foi obtido e está apresentado na Figura 24. Sabe-se que a razão I_1/I_3 varia de acordo com a polaridade do meio, de valores em torno de 1,8 para solventes polares até 0,6 em solventes apolares. Assim, observa-se que a razão I_1/I_3 diminui acentuadamente na presença do polímero modificado enquanto que essa variação para o lentinan é pouco acentuada.

Na presença de $0,13 \text{ mg.mL}^{-1}$ de lentinan o valor da razão I_1/I_3 fica em torno de 1,75 enquanto que na presença de $0,13 \text{ mg.mL}^{-1}$ de LT-Dod esse valor diminui para 1,45. Para o polímero modificado a razão continua diminuindo gradualmente em função do aumento da concentração do LT-Dod estabilizando em $I_1/I_3=1,18$, porém a razão I_1/I_3 para o LT estabiliza em 1,45. Este fato ocorre porque o pireno sente um ambiente mais apolar, o que indica o aumento da hidrofobicidade do polímero modificado devido aos grupos dodecanoato.

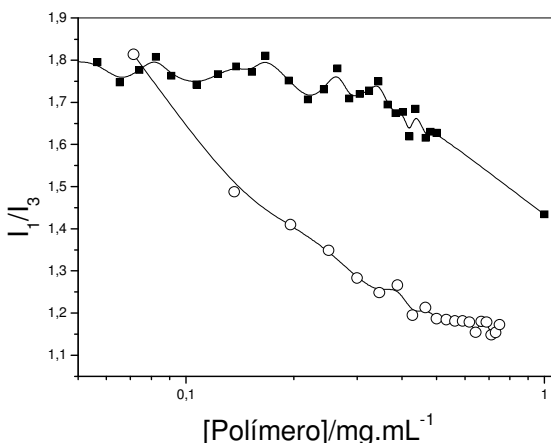


Figura 24. Razão I_1/I_3 versus a concentração de polímero LT (■) e LT-Dod (○).

4.3.5 Determinação da massa molar do lentinan por espalhamento de luz estático

Primeiramente foi calculado o valor de dn/dc para o lentinan em 20 mmol.L⁻¹ de NaOH utilizando soluções com concentrações de 0,02mg.mL⁻¹, 0,05mg.mL⁻¹, 0,07mg.mL⁻¹, 0,1mg.mL⁻¹ e 0,2 mg.mL⁻¹, sendo obtido um valor de 0,145 mL.g⁻¹ para o lentinan em 20 mmol.L⁻¹ de NaOH.

As medidas de espalhamento de luz estático foram feitas com as mesmas soluções citadas anteriormente. Através dessas medidas, foi possível a construção dos gráficos exibidos nas Figuras 25 e 26; destas figuras obtiveram-se os valores de massa molar média aparente do Lentinan R_g e A_2 .

A curva apresentada na Figura 25 representa um experimento de dependência angular do espalhamento onde a concentração do polímero foi constante. Essa curva foi extrapolada para ângulo zero ($\theta=0$) e o coeficiente linear dessa curva é igual ao inverso da massa molar ($1/M_{w,app}$), enquanto que o coeficiente angular da curva fornece R_g através da seguinte relação (ver equações 8 e 10) :

$$\text{Coef.Angular} = \frac{16\pi^2}{3\lambda^2} \cdot R_g^2$$

Onde λ é o comprimento de onda do Laser, neste caso 620 nm.

Os valores de $M_{w,app}$ e R_g para o lentinan foram de $9,69 \times 10^5$ g.mol⁻¹ e 154 nm, respectivamente. Os valores de $M_{w,app}$ e R_g mostram-se satisfatórios, aceitáveis quando comparados com resultados encontrados por Xu ($M_w = 9 \times 10^5$ g.mol⁻¹ e $R_g = 213$ nm) [28].

A curva da Figura 26 representa a dependência do espalhamento com a concentração de de Lentinan no ângulo de espalhamento $\theta=90^\circ$. A curva obtida foi extrapolada para concentração zero ($c=0$) e o coeficiente linear dessa curva é igual ao inverso da massa molar polimérica ($1/M_{w,app}$), enquanto que o coeficiente angular da curva fornece A_2 , sendo coeficiente angular= $2A_2$ (ver equação 10). Os valores de $M_{w,app}$, A_2 encontrados foram $9,41 \times 10^5$ g.mol⁻¹ e $1,01 \times 10^{-3}$ mL.mol.g⁻² respectivamente. O valor positivo de A_2 indica que a solução de NaOH 20 mmol.L⁻¹ é um bom solvente para o lentinan, neste caso a interação polímero-solvente é maior que a interação polímero-polímero.

Com os valores de $M_{w,app}$ e A_2 é possível calcular-se o valor da Concentração de sobreposição, $*c$, ou seja, a concentração onde a cadeia polimérica interfere no volume de exclusão da cadeia vizinha. É a

concentração de transição entre o regime diluído e o semidiluído. Em valores abaixo da $*c$, as interações entre as macromoléculas em solução são muito pequenas e as cadeias poliméricas comportam-se independentemente, interagem primeiramente com as moléculas dos solventes e a solução tem um comportamento próximo de uma solução ideal [33]. Para o cálculo da $*c$ foi usada seguinte relação [65]:

$$*c = \frac{1}{Mw_{app}.A_2} = \frac{1}{9,41 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1} . 1,01 \times 10^{-3} \text{ mL.mol.g}^{-2}}$$

$$*c = 1,05 \text{ mg.mL}^{-1}$$

O valor de $*c = 1,05 \text{ mg.mL}^{-1}$ para o Lentinan em 20 mmol.L^{-1} NaOH é maior que o valor encontrado por Xu [66] para o lentinan somente em água $*c = 0,38 \text{ mg.mL}^{-1}$. A diferença dos valores é devido a quebra das ligações de hidrogênio inter e intramolecular das cadeias do lentinan, promovida pela adição de NaOH. Essas ligações de hidrogênio dificultam a mobilidade e solubilidade do Lentinan em solução, diminuindo assim a concentração de sobreposição. Logo, como a presença de NaOH em solução faz com que as cadeias fiquem mais livres, ocorre então um aumento na interação polímero-solvente, consequentemente elevando o valor de $*c$.

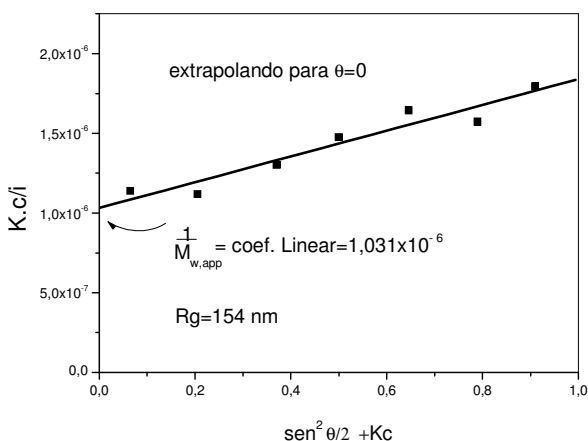


Figura 25. Gráfico de Zimm parcial para a dependência angular do espalhamento de luz de solução aquosa do lentinan ($c=0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$) em NaOH 20 mmol.L^{-1} .

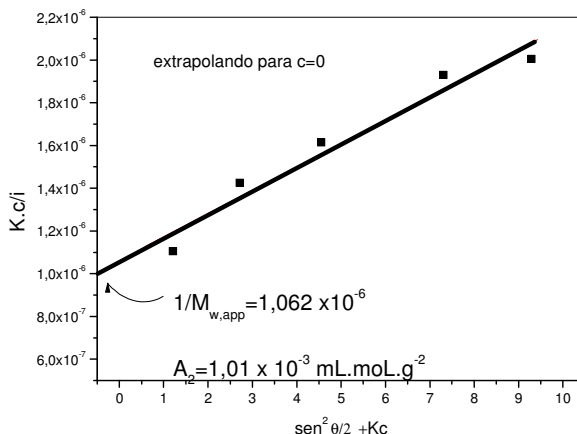


Figura 26. Gráfico de Zimm parcial para o espalhamento de luz de soluções aquosas de lentinan em NaOH 20 mmol.L⁻¹ medidas em ângulo constante ($\theta=90^\circ$).

4.3.6 Determinação da massa molar do lentinan modificado (LT-Dod) por espalhamento de luz estático.

Foi calculado o valor de dn/dc para o lentinan modificado em 500 mmol.L⁻¹ de uréia utilizando soluções com concentrações de 0,02 mg.mL⁻¹, 0,05 mg.mL⁻¹, 0,07 mg.mL⁻¹, 0,1 mg.mL⁻¹ e 0,2 mg.mL⁻¹ obtendo-se um valor de 0,174 mL.g⁻¹ para o LT-Dod em 500mmol.L⁻¹ de uréia. Nesse caso, tratando-se de um polímero modificado, onde foram introduzidos grupos ésteres, que por sua vez podem sofrer hidrólise na presença de uma base forte como NaOH, sendo assim, para evitar a hidrólise, melhorar a solubilidade do LT-Dod e facilitar as medidas de espalhamento de luz foi utilizada uma solução aquosa de uréia como solvente para as medidas de espalhamento de Luz estático. A uréia assim como o NaOH atua quebrando as ligações de hidrogênio inter e intramoleculares presentes no lentinan, melhorando sua solubilidade em água.

As medidas de espalhamento de luz estático foram feitas com as mesmas soluções citadas anteriormente. Através dessas medidas foram feitas a construção de gráficos (Figuras 27 e 28) utilizando o mesmo formalismo aplicado para o Lentinan no item 4.4, obtendo-se os valores

de Massa Molar média aparente do Lentinan ,Rg e A₂ e *c,apresentados na tabela 5.

Tabela 5. Parâmetros físico-químicos obtidos para o LT-Dod por SLS.

	M _{w,app}	Rg	A ₂	*c
θ= 0	2,34 X 10 ⁶ g.mol ⁻¹	366 nm	---	---
c= 0	1,86 X10 ⁶ g.mol ⁻¹	--	2,79 X 10 ⁻⁷ mL.moL.g ⁻²	1,96mg.mL ⁻¹

O valor positivo de A₂ apresentado na Tabela 6 indica que a solução de uréia 500 mmol.L⁻¹ é um bom solvente para o LT-Dod. Como visto, o valor de A₂ obtido para o LT-Dod é bem menor que o segundo coeficiente virial (A₂) obtido para o lentinan. Essa diferença de valores pode ser atribuída ao aumento da interação polímero-polímero provocada pelos grupos dodecanoatos, diminuindo assim a interação polímero-solvente.

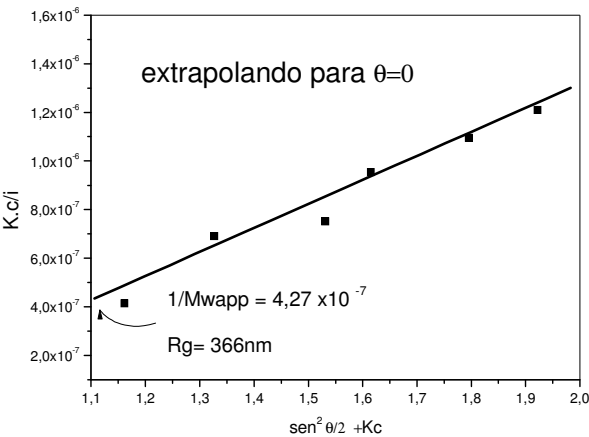


Figura 27. Gráfico de Zimm parcial para a dependência angular do espalhamento de luz para o LT-Dod 0,1mg.mL⁻¹ em solução aquosa de uréia 500 mmol.L⁻¹.

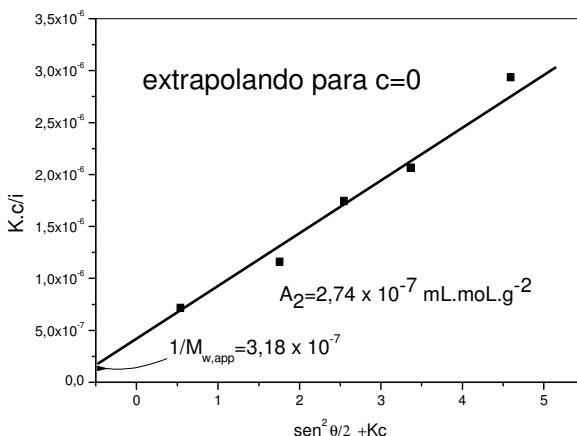


Figura 28. Gráfico de Zimm parcial para a dependência da intensidade do espalhamento de luz com a concentração de LT-Dod em soluções aquosas de uréia 500 mmol.L^{-1} no ângulo de 90° .

4.3.7 Determinação do raio hidrodinâmico do lentinan por espalhamento de luz dinâmico (DLS).

Na Figura 29 estão apresentadas as curvas de autocorrelação g_2 de DLS no ângulo de 90° do lentinan em água e lentinan em 80 mmol.L^{-1} de NaOH. Observa-se que para o lentinan em água a curva tem um tempo de relaxação maior do que o apresentado pelo lentinan em 80 mmol.L^{-1} de NaOH. Isso ocorre principalmente devido ao fato do lentinan em água apresentar um raio hidrodinâmico com tamanhos superiores ao lentinan em NaOH. Através desses dados foi possível obter os histogramas de distribuição de tamanho apresentados na Figura 30, utilizando o método de CONTIN [67].

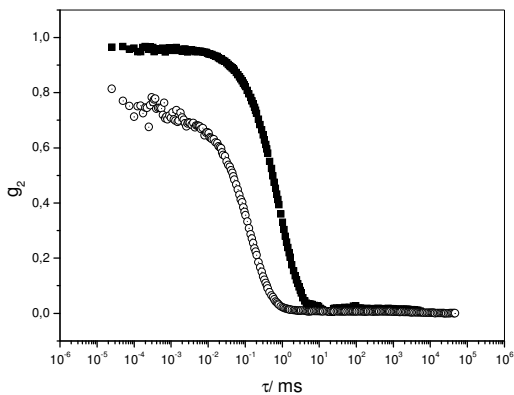


Figura 29. Curvas g_2 de autocorrelação de DLS no ângulo de 90° para o lentinan (■) em água (○) e em 80 mmol.L^{-1} NaOH.

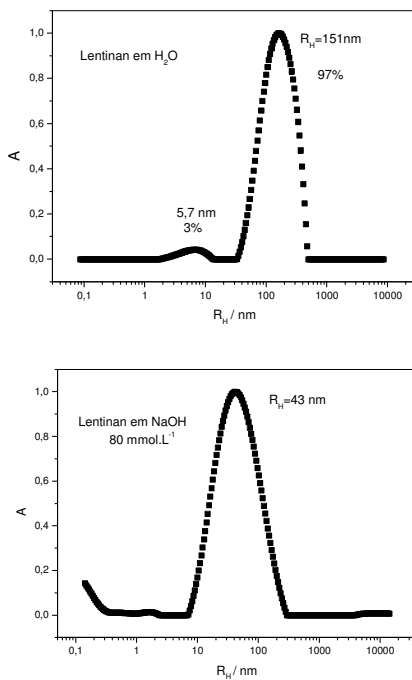


Figura 30. Histograma de distribuição de tamanho dado pela inversão de CONTIN da curva de autocorrelação no ângulo de 90° .

A análise dos histogramas de distribuição de tamanho permitiu verificar que o aumento na concentração de NaOH em solução provoca uma gradual diminuição no raio hidrodinâmico do Lentinan. Esses resultados concordam com os estudos de viscosidade feitos por Xu e Zhang [66, 68]. Segundo os autores, a presença de NaOH em solução provoca a quebra das ligações de Hidrogênio inter e intramoleculares que mantêm as cadeias de lentinan unidas. Essas ligações são responsáveis por manter o lentinan na forma de tripla hélice, porém essa conformação é totalmente perdida dependendo da concentração de NaOH.

Como pode-se ver na Figura 31 o raio hidrodinâmico das cadeias de lentinan sofre um decréscimo à medida que se aumenta a concentração de NaOH em solução, devido à transição conformacional das cadeias de Lentinan, mudando de tripla hélice para hélice simples em concentrações de NaOH acima de 80 mmol.L⁻¹ (Figura 31), provocando consequentemente uma diminuição no raio hidrodinâmico.

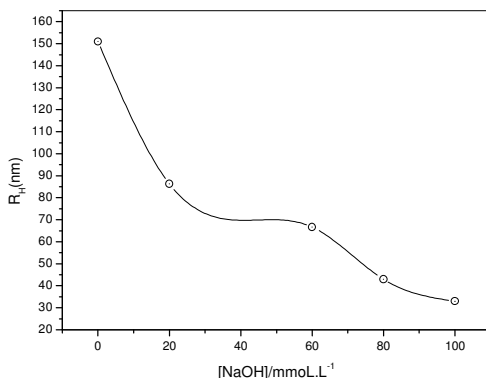


Figura 31. Dependência do raio hidrodinâmico do lentinan em função da concentração de NaOH.

4.3.8. Determinação do Raio Hidrodinâmico do LT-Dod por Espalhamento de Luz Dinâmico.

As análises para o cálculo do Raio Hidrodinâmico do LT-Dod foram feitas em uma mistura de Dimetilsulfóxido e água utilizando a razão Água/DMSO (v/v) como descrito na Tabela 6:

Tabela 6. Razões Água/DMSO utilizadas para fazer as soluções de LT-Dod empregadas no calculo do raio hidrodinâmico.

DMSO	Água
40%	60%
70%	30%
100%	0%

A Figura 32 mostra um gráfico com os valores de R_H para o LT-Dod em função da porcentagem de DMSO % na solução. Observa-se uma diminuição no valor de R_H em função do aumento da porcentagem de DMSO. Esse comportamento evidencia a quebra das ligações de hidrogênio inter e intramoleculares presentes também no LT-Dod. Os valores altos de R_H podem ser explicados, levando-se em conta a maior hidrofobicidade do LT-Dod em relação ao lentinan devido introdução dos grupos hidrofóbicos, favorecendo a formação de agregados de LT-Dod em solução aumentando consequentemente a massa molar, raio de giração e o raio hidrodinâmico, quando comparado com o lentinan.

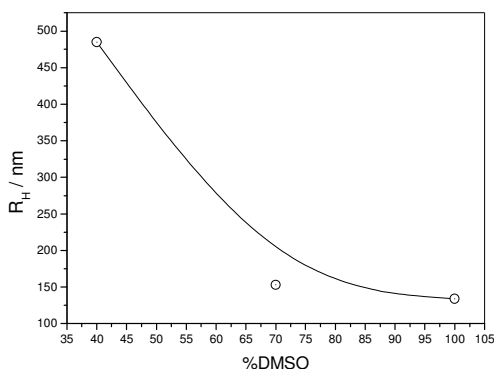


Figura 32. Dependência do Raio Hidrodinâmico versus a concentração de DMSO em água .

As tabelas a seguir mostram os dados obtidos pela técnica de espalhamento de luz (SLS e DLS) para o LT e LT-Dod.

Tabela 7.Parâmetros físico-químicos obtidos para o lentinan em NaOH 20mmol.L⁻¹.

Parâmetro	Valor
Concentração de <i>overlap</i> , c [*]	1,05mg.mL ⁻¹
<i>dn/dc</i>	0,145 mL.g ⁻¹
M _{w,app}	9,41 x10 ⁵ g.moL ⁻¹
Segundo coeficiente virial, A ₂	1,01 x 10 ⁻³ mL.mol.g ⁻²
Raio de giração, R _g	154 nm
Raio hidrodinâmico, R _H	87 nm

Tabela 8.Parâmetros físico-químicos obtidos para o LT-Dod.

Parâmetro	Valor	Solvente
Concentração de <i>overlap</i> , c [*]	1,96mg.mL ⁻¹	500 mmol.L ⁻¹ uréia
<i>dn/dc</i>	0,174 mL.g ⁻¹	500 mmol.L ⁻¹ uréia
M _{w,app}	1,86x10 ⁶ g.moL ⁻¹	500 mmol.L ⁻¹ uréia
Segundo coeficiente virial,A ₂	2,79 x 10 ⁻⁷ mL.moL.g ⁻²	500 mmol.L ⁻¹ uréia
raio de giro, R _g	366 nm	500 mmol.L ⁻¹ uréia
raio hidrodinâmico, R _H	490 nm	40% DMSO

4.4 TRANSIÇÃO DE TRIPLA-HÉLICE PARA HÉLICE SIMPLES DO LENTINAN EM ÁGUA INVESTIGADA POR ESPALHAMENTO DE RAIOS-X A BAIXOS ÂNGULOS (SAXS).

4.4.1 Estrutura fractal do Lentinan

A Figura 33 e 34 mostram o gráfico do duplo logaritmo entre a intensidade de espalhamento I(q) e valores absolutos do vetor de espalhamento q (=4πsen(θ/2)/λ) para o Lentinan em pó a 25 °C (Figura 26) e soluções aquosas com 1mg.mL⁻¹ de lentinan (fig.27) em varias concentrações de soluções aquosas de NaOH a 25°C.

Na figura 34 cada uma das curvas de espalhamento foi deslocada verticalmente por um fator A para evitar a sobreposição das mesmas e obter uma melhor visualização. A interpretação da dependência angular da intensidade do espalhamento de raios-X é simplificada quando a geometria fractal é usada na descrição de sua estrutura. A intensidade de SAXS para objetos fractais em altos ângulos de espalhamento segue a equação [69, 70]:

$$I(q)=I_0(q)^{-\alpha}$$

(19)

Quando então o sistema apresenta estrutura fractal, uma região linear é observada no gráfico $\log I(q)$ vs. $\log (q)$, cujo coeficiente angular é $-\alpha$; se $1<\alpha<3$, então a região resulta de um fractal de volume (massa ou poros) e se $3<\alpha<4$ então a região resulta de um fractal de superfície, cuja dimensão desta unidade básica do fractal é o coeficiente angular α . Uma relação entre dimensão fractal e a topologia foi estabelecida na tabela 9.

Tabela 9. Relação entre dimensão fractal e a topologia [14, 44, 71].

Topologia	Dimensão Fractal
Cadeia polimérica Gaussiana	5/3
Esfera com superfície fractal	2,5 a 3
Esfera com superfície lisa	3
Polímero ramificado solvatado	2

Na figura 33, o valor de $\alpha = -4$ para o Lentinan em pó descreve a Lei de POROD [71] para este material, com domínios exibindo uma superfície lisa sem formação de estrutura fractal.

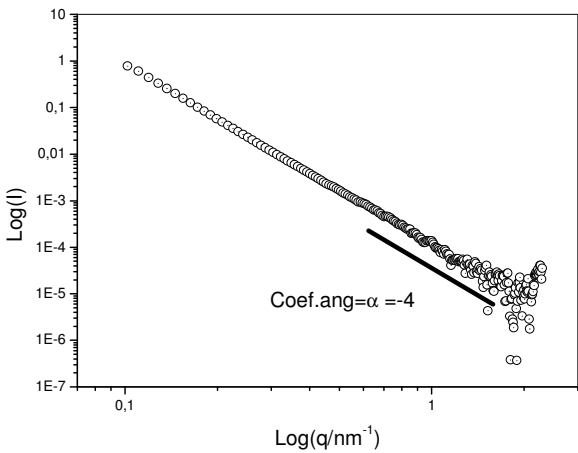


Figura 33. Dependência angular da intensidade de espalhamento $I(q)$ para o lentinan em pó a 25 °C, com a indicação do coeficiente angular da região de altos ângulos.

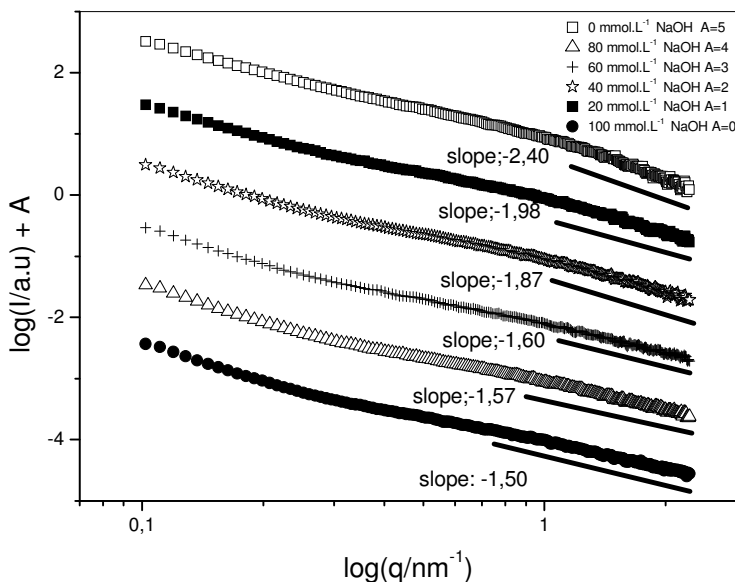


Figura 34. Dependência angular da intensidade de espalhamento $I(q)$ para soluções aquosas com 1mg.mL^{-1} de lentinan em várias concentrações NaOH a 25°C , com indicação do coeficiente angular das regiões lineares a altos ângulos. Cada curva foi verticalmente deslocada por um fator A.

Como mostrado na Figura 34, a intensidade de espalhamento varia de $q^{-1,98}$ à $q^{-1,50}$ para os sistemas 20mmol.L^{-1} e 100mmol.L^{-1} NaOH, respectivamente. Os valores de α estão dentro do limite de uma estrutura com fractal de volume. De acordo com a Tabela 9, com o aumento na concentração de NaOH na solução o polímero mostra uma mudança em sua dimensão fractal, indo de valores próximos a 2 (polímero solvatado) para valores próximos a $5/3$ (cadeia polimérica gaussiana). Essa mudança sugere, como descrito por outros autores e diferentes técnicas, uma transição na morfologia do lentinan de cadeias na forma de Hélice Tripla para cadeias simples, aleatoriamente dispostas em solução [16, 26].

4.4.2 Gráfico de Kratky

O gráfico de Kratky é um formalismo bastante empregado no estudo da morfologia de polímeros através de SAXS. É muito utilizado para analisar a conformação de proteínas e polissacarídeos[14, 49]. A figura 35 mostra o gráfico de Kratky ($I(q) \cdot q^2$ vs q). A rigidez da associação molecular das cadeias pode ser estimada através do gráfico de Kratky[49, 72]:

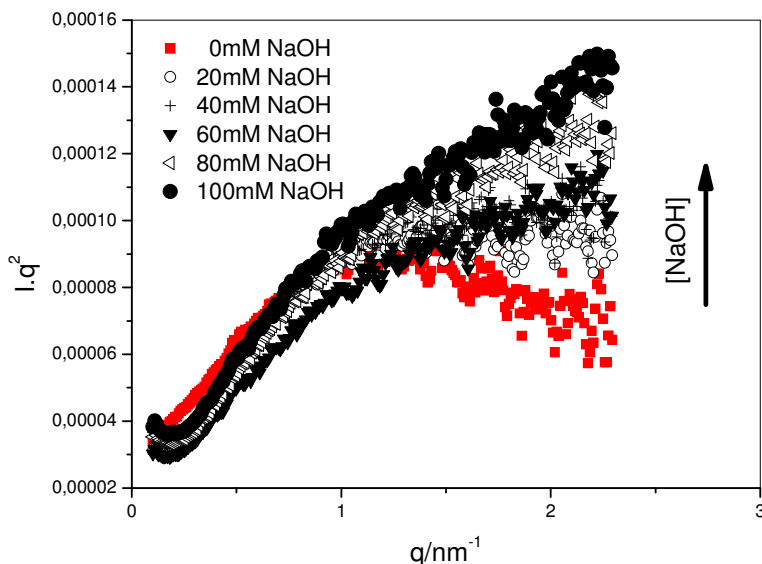


Figura 35. Gráfico de Kratky para soluções aquosas com $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de Lentinan em varias concentrações de NaOH a 25°C .

No caso de uma cadeia gaussiana (polímero randomicamente enovelado) as curvas de espalhamento mostram uma região de platô. Porém a curva não alcança valores assintóticos para altos valores de q e cresce secundariamente com o aumento de q até a região de platô. No segundo caso, considerando o polímero como um bastão rígido, as curvas de espalhamento aumentam com o aumento de q até alcançarem uma região de platô.

Como podemos ver na Figura 35 a curva de espalhamento no gráfico de Kratky para os sistemas contendo $80 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ e $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ de NaOH, crescem secundariamente ao aumento de q e um suave

platô é observado. Esse comportamento é característico de cadeias poliméricas gaussianas.

Entretanto, os gráficos de Kratky para os sistemas de $0 \text{ mmol.L}^{-1} \sim 60 \text{ mmol.L}^{-1}$ NaOH mostram claros platôs, que podem ser aproximados ao comportamento de partículas na forma de bastão (para este caso a estrutura de tripla hélice do Lentinan é aproximada a forma de um bastão rígido). Esse resultado experimental sugere que a conformação das cadeias de lentinan gradualmente muda de bastões (tripla hélice) para cadeias simples aleatoriamente dispostas em solução (hélice simples) com o aumento da concentração de NaOH (Figura 36). Essa transição é promovida pelo NaOH, como já mencionado antes, resultando na quebra das ligações de hidrogênio inter e intra moleculares que mantêm as cadeias de lentinan unidas na forma de tripla hélice.

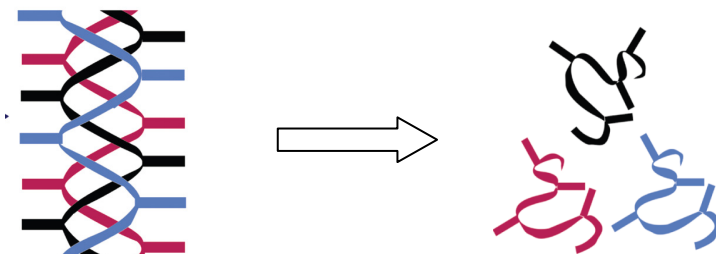


Figura 36. Ilustração da transição de tripla hélice para hélice simples das cadeias de lentinan.

4.4.3 Cálculo do raio de giração lateral (R_{gc})

Com a finalidade de melhor entender a associação do lentinan na forma de bastão em baixas concentrações de NaOH em solução, o raio de giração lateral para uma partícula em forma de bastão foi estimado usando os dados obtidos por SAXS. A aproximação de Guinier para intensidade de espalhamento da metade da seção transversal fornece o raio de giração lateral para partícula através da seguinte relação [9, 49, 72]:

$$I_C(q) = I_0(q) \exp\left(-\frac{R_{gc}^2 q^2}{2}\right)$$

$$slope = -\frac{R_{gc}^2}{2} = \left(\frac{\partial I_C}{\partial q^2}\right)$$

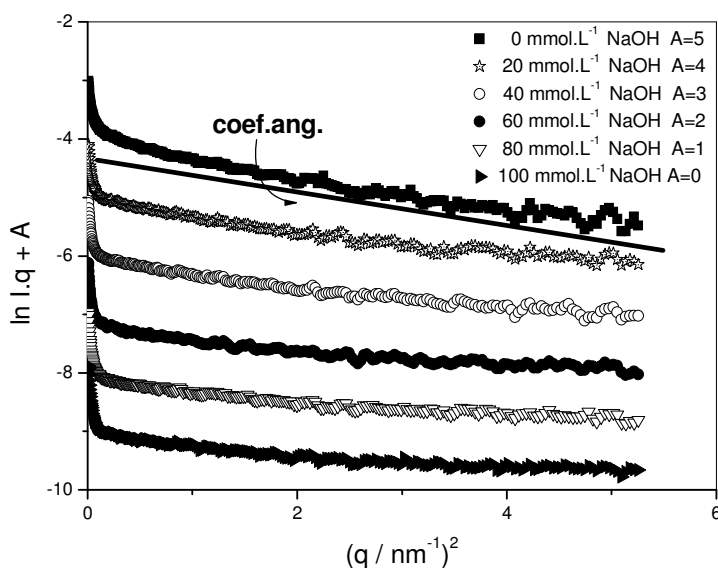
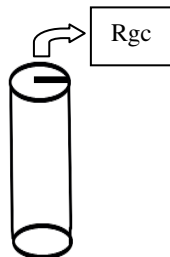


Figura 37. Dependência angular do termo $\ln I(q)q$ para soluções aquosas com 1mg.mL^{-1} de Lentinan em varias concentrações de NaOH a 25°C . Os valores de $\ln I(q)q$ para os sistemas contendo NaOH foram verticalmente deslocados por um fator A para melhor visualização.

Tabela 10.Raio de giração lateral obtidos para o lentinan em diferentes concentrações de NaOH.

NaOH, mmol.L ⁻¹	Rgc (Å)	Slope
0	8,0	-0,347
20	6,5	-0,252
40	6,0	-0,232
60	5,3	-0,189
80	---	-----
100	---	-----

Através do coeficiente angular obtido das curvas presentes Figura 37, podemos estimar o raio de giração lateral das cadeias de lentinan usando a equação 19, descrita acima. Observa-se na Tabela 10 que existe um decréscimo no valor do Rgc à medida que se aumenta a concentração de NaOH em solução. Esses valores podem ser atribuídos à dissociação da tripla hélice do lentinan (Figura 38) em hélice simples, como observado através do gráfico de Kratky e os valores de raio hidrodinâmico obtidos por DLS neste trabalho. Em valores mais altos de NaOH o formalismo para um bastão não pode ser mais aplicado ao sistema pois o lentinan a partir de uma concentração de NaOH de 80 mmol.L⁻¹ encontra-se na forma de novelo aleatório em solução, conforme observados através dos resultados de DLS e gráfico de Kratky.

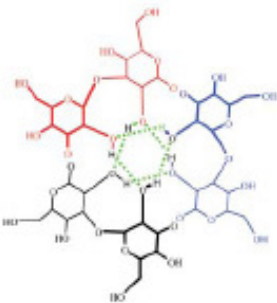


Figura 38. Esquema da visão superior da tripla hélice do lentinan. As linhas pontilhadas em verde representam as ligações de hidrogênio que mantêm as cadeias do lentinan unidas.

4.5 MEDIDAS DE FLUORESCÊNCIA E TENSÃO SUPERFICIAL PARA OS SURFACTANTES SB3-12 E SB3-14.

4.5.1 Medidas de Fluorescência para a SB3-12 e SB3-14.

Na Figura 39 observa-se que a razão I_1/I_3 a baixas concentrações do SB3-12, antes da *cmc*, cerca de 1,75. Assim que as micelas de SB3-12 são formadas esta razão decresce a 1,35, indicando uma mudança no micro ambiente onde o pireno se encontra. Devido à baixa solubilidade na fase aquosa, as moléculas de pireno migram para a fase micelar. Nesse caso, os valores das *cmc* foram obtidos no início do segundo platô; esse mesmo método foi utilizado também por outros autores [73, 74]. Pela Figura 39, obtém uma *cmc* de 2,90 mmol.L⁻¹ para a SB3-12.

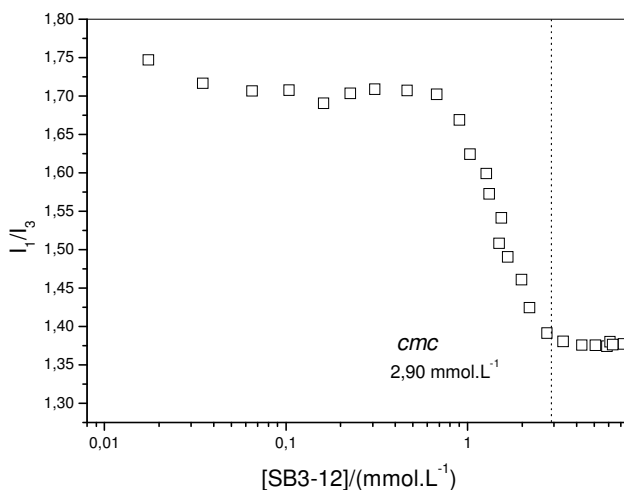


Figura 39. Razão I_1/I_3 versus a concentração de SB3-12 em água (\square).

O valor de *cmc* para o SB3-14 encontrado foi de 0,39 mmol.L⁻¹, Figura 40, foi obtido usando o mesmo método empregado na determinação da *cmc* da SB3-12 no parágrafo anterior. O valor menor de *cmc* encontrado para a SB3-14 em relação a SB3-12 é devido à maior hidrofobicidade das cadeias de SB3-14, possuindo uma cauda apolar

contendo quatorze carbonos enquanto que a parte apolar do SB3-12 possui somente doze carbonos. Ou seja, o Efeito Hidrofóbico é maior nas moléculas de SB3-14.

Os valores de *cmc* encontrados para ambos os surfactantes estão coerentes com resultados encontrados na literatura [33, 75].

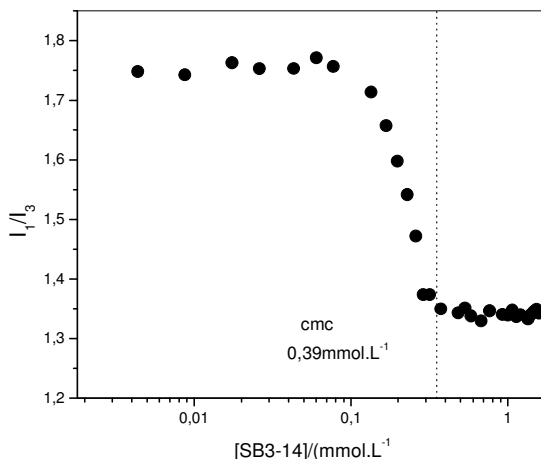


Figura 40. Razão I_1/I_3 versus a concentração de SB3-14 em água (●).

4.5.2 Medidas de tensão superficial para a SB3-12 e SB3-14.

As Figuras 41 e 42 mostram a curva de tensão superficial da SB3-12 e SB3-14 em solução aquosa 25°C, respectivamente. Na Figura 41 nota-se que há um ponto de descontinuidade atribuído à *cmc* da SB3-12, que ocorre em 2,53mmol.L⁻¹, numa tensão superficial de 37,7 mN.m⁻¹. Os resultados obtidos para a SB3-14 representados na Figura 42, indicam o início da *cmc* em 0,39 mmol.L⁻¹ e $\gamma = 37\text{mN.m}^{-1}$.

Esses valores de tensão superficial na região de formação de micelas concordam com valores descritos na literatura para surfactantes zwitteriônicos (normalmente entre 30-40mN.m⁻¹) [2].

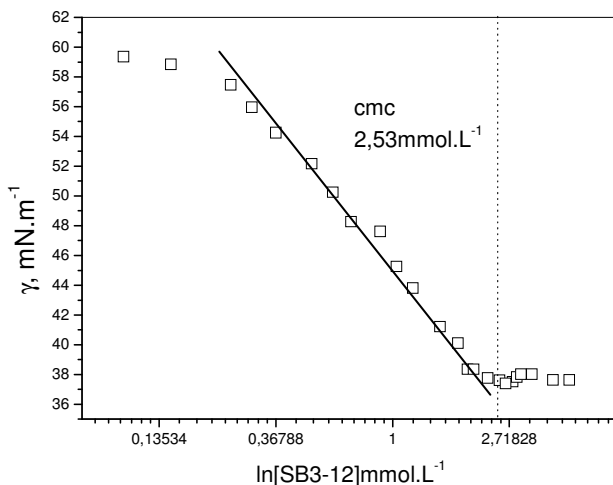


Figura 41. Tensão superficial *versus* \ln [SB3-12] em solução aquosa a 25°C.

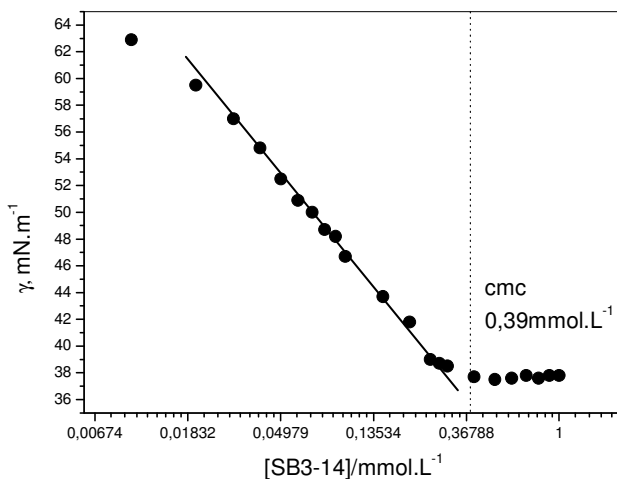


Figura 42. Tensão superficial *versus* \ln [SB3-14] em solução aquosa a 25°C.

Ainda usando os gráficos anteriores, através do Coeficiente angular de cada reta, e com as Equações 17 e 18, os seguintes parâmetros puderam ser obtidos Γ_{\max} = *concentração em excesso na superfície*, A_{\min} = *área mínima ocupada por molécula de surfactante*. Segue os cálculos de Γ_{\max} e A_{\min} para a SB3-12:

$$\gamma = -\Gamma RT \ln C$$

$$\Gamma = \frac{-1}{RT} X \frac{\Delta\gamma}{\Delta \ln C}$$

$$\frac{\Delta\gamma}{\Delta \ln C} = -\Gamma RT$$

$$\Gamma = \frac{-1 \cdot (7,81 \times 10^{-3} \text{ N.m}^{-1})}{8,314 \text{ N.m.K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \times 298 \text{ K}}$$

$$\Gamma = 3,15 \times 10^{-6} \text{ mol.L.m}^{-2}$$

A área ocupada por molécula é dada pelo inverso de Γ , considerando que em um mol há $6,02 \times 10^{23}$ moléculas, assim:

$$A = \frac{1}{\Gamma N} \quad A = 53 \text{ \AA}^2 \cdot \text{molécula}^{-1}$$

Ou seja, a área ocupada por molécula de SB3-12 na interface ar-água é de $A_{\min} = 53 \text{ \AA}^2 \cdot \text{molécula}^{-1}$.

Para a SB3-14, o coeficiente angular da porção linear (figura 41), é igual a $-8,10 \times 10^{-3} \text{ N.m}^{-1}$. Seguindo a mesma metodologia anterior, determinou-se o valor da *concentração de excesso na superfície* $\Gamma_{\max} = 3,26 \times 10^{-6} \text{ mol.L.m}^{-2}$, o valor da *área ocupada por molécula* de SB3-14 na superfície e obteve-se um valor de $A = 50,8 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$. (Para efeito de comparação: A_{\min} encontrada para um surfactante iônico como o Dodecil Sulfato de Sódio fica na faixa de $21 \text{ \AA}^2 \cdot \text{molécula}^{-1}$ [33]).

A investigação das propriedades interfaciais dos surfactantes em solução pode fornecer informações sobre as interações soluto-soluto e solvente-soluto. Pode-se observar que ocorre um aumento no valor de Γ_{\max} e uma diminuição no valor de A_{\min} à medida em que se aumenta o tamanho da cadeia do surfactante. Este comportamento mostra que quanto maior a hidrofobicidade das cadeias de surfactante, maior é a tendência dessas cadeias em migrar do meio da solução para a interface ar/solvente (pois há menos afinidade entre as moléculas do surfactante e solvente) resultando numa superfície mais empacotada.

4.6 AUTO-ASSOCIAÇÃO DO LENTINAN E LT-DOD COM SB3-12 E SB3-14.

Foram realizadas análises para verificar a formação de complexos entre o lentinan e surfactantes aniônicos, catiônicos e zwitteriônicos. Porém observou-se a interação do lentinan somente na presença de surfactantes zwitteriônicos.

4.6.1 Medidas de fluorescência para os sistemas LT/SB3-12 e LT/SB3-14.

Como pode ser observado na figura 43, comparando-se os perfis de I_1/I_3 na ausência e em presença do polímero, verifica-se uma mudança expressiva entre os perfis, causado pela associação da SB3-12 com o lentinan. As curvas indicam que o início da associação (*cac*), formação de agregados entre o lentinan e a SB3-12 ocorre em $1,70 \text{ mmol.L}^{-1}$ enquanto que a *cmc* do surfactante só aparece em $2,90 \text{ mmol.L}^{-1}$. Isto é um indício da interação cooperativa entre o polímero e o surfactante.

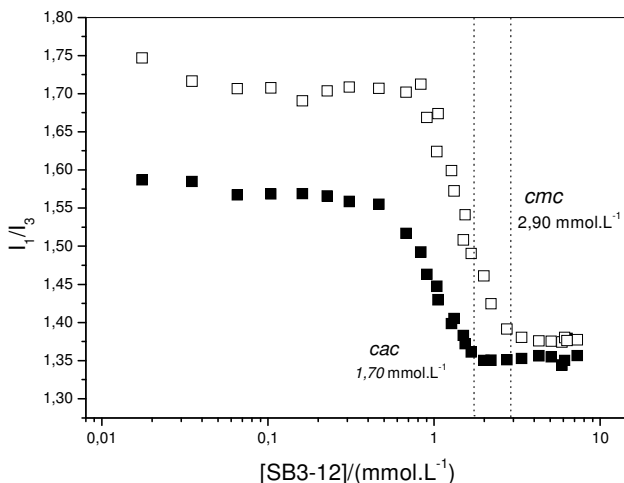


Figura 43. Razão I_1/I_3 vs. Concentração de SB3-12 na ausência (\square) e na presença de $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ de Lentinan (\blacksquare).

A Figura 44, mostra um comportamento semelhante ao anterior para a SB3-14, ocorrendo o início da formação de agregados polímero-surfactante a partir de uma concentração $0,20 \text{ mmol.L}^{-1}$ de SB3-14. Esses resultados de fluorescência mostram que ocorre um processo de auto-associação entre os surfactantes em estudo e o polímero lentinan.

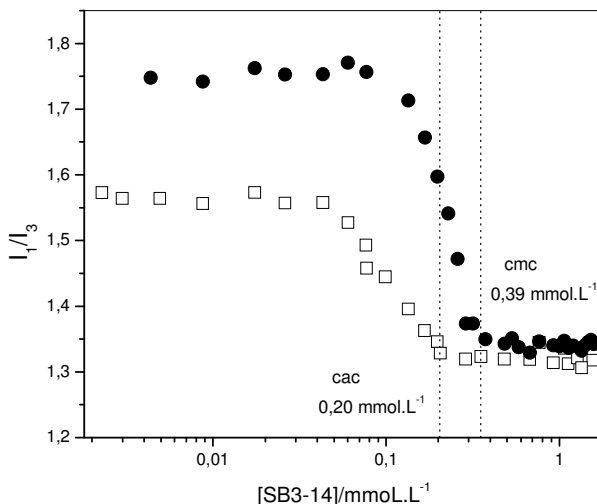


Figura 44. Razão I_1/I_3 vs. Concentração de SB3-14 na ausência (●) e na presença de $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ de Lentinan (□).

4.6.2 Medidas de tensão superficial para os sistemas LT/SB3-12 e LT/SB3-14.

A Figura 45 mostra o perfil de tensão superficial da SB3-12 na ausência e em presença de $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ de lentinan em solução aquosa. Na ausência de Lentinan, a tensão superficial diminui até estabilizar, formando um platô a partir de $37,7 \text{ mN/m}$ e $2,53 \text{ mmol.L}^{-1}$ representando a *cmc*, como já discutido no item 4.9.2.

Na presença de lentinan observa-se que a estabilização da tensão superficial ocorre em concentrações menores, quando comparado com a curva do surfactante na ausência de polímero, ocorrendo em $37,5 \text{ mN/m}$ e $1,50 \text{ mmol.L}^{-1}$ de SB3-12, definido como o início da *cac*. Nesta Figura pode-se notar que o complexo polímero-

surfactante não exibe propriedades superficiais tão acentuadas, como visto para complexos formados por outros sistemas.

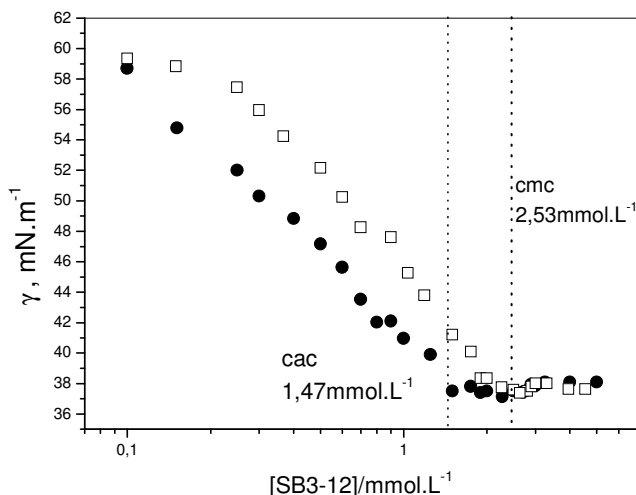


Figura 45. Tensão superficial *versus* $\ln[\text{SB3-12}]$ na ausência (\square) e na presença de $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ de Lentinan (\bullet) em solução aquosa a 25°C .

A curva tensiométrica de SB3-14 obtida na presença de lentinan (Fig. 46) representa um perfil clássico de interação polímero-surfactante. O início do ligeiro patamar na curva antes da *cmc*, observada em $41,6 \text{ mN.m}^{-1}$ e em $0,1 \text{ mM}$ de SB3-14, caracteriza a *cac*. Com o aumento da concentração de SB3-14 a tensão volta a cair e estabiliza em torno de 37 mN.m^{-1} , valor próximo ao encontrado para a *cmc* do surfactante puro. Em ambos os casos para a SB3-12 e SB3-14 a visualização do ponto de saturação do polímero, *psp*, foi dificultado pela sobreposição das curvas na ausência e na presença do polímero.

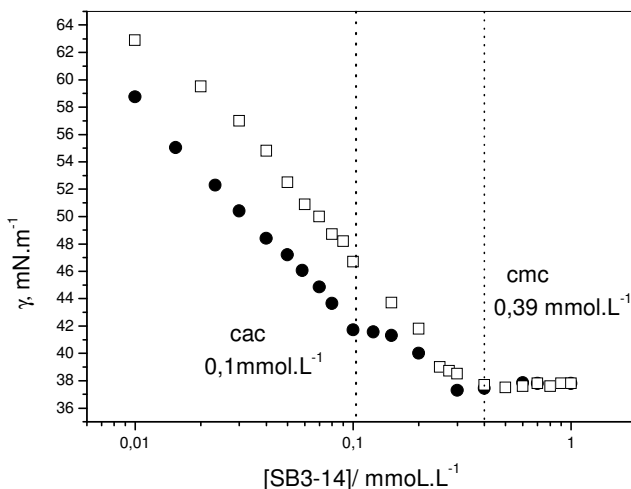


Figura 46. Tensão superficial *versus* ln[SB3-14] na ausência (□) e na presença de 0,5mg.mL⁻¹ de Lentinan (●) em solução aquosa a 25°C.

4.6.3 Intensidade do espalhamento de luz estático para os sistemas LT/SB3-12 e LT/SB3-14.

As medidas de espalhamento de luz estático (SLS) para o sistema SB3-12/LT SB3-14/LT estão representadas nas Figuras 47 e 48, respectivamente. Neste experimento, acompanhou-se a intensidade de luz espalhada no ângulo de 90° de soluções de lentinan 0,5 mg.mL⁻¹ em função da concentração de surfactante com a finalidade de confirmar os parâmetros de associação dos sistemas obtidos pelas outras técnicas. Como a intensidade de espalhamento é proporcional ao número N e ao quadrado da polarizabilidade α dos espalhadores, é possível se acompanhar as variações das características eletrônicas das moléculas por esse método (equação 21).

$$I = I_0 \frac{8\pi N \alpha^2}{\lambda^4 R^2} (1 + \cos^2 \theta) \quad (21)$$

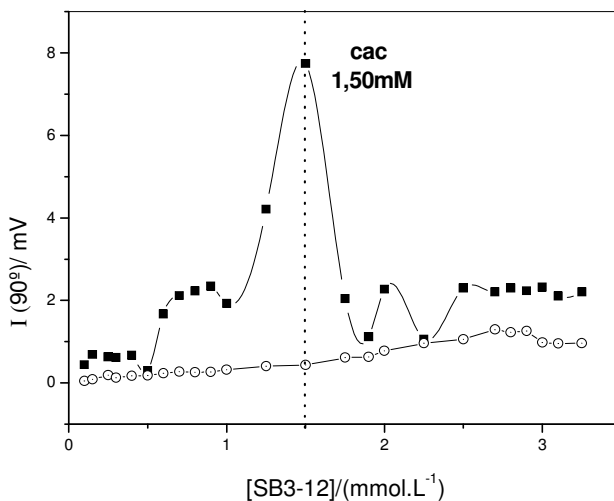


Figura 47. Intensidade de luz espalhada para o sistema e SB3-12/Lentinan (○) na ausência (■) e na presença de 0,5 mg.mL⁻¹ de lentinan .

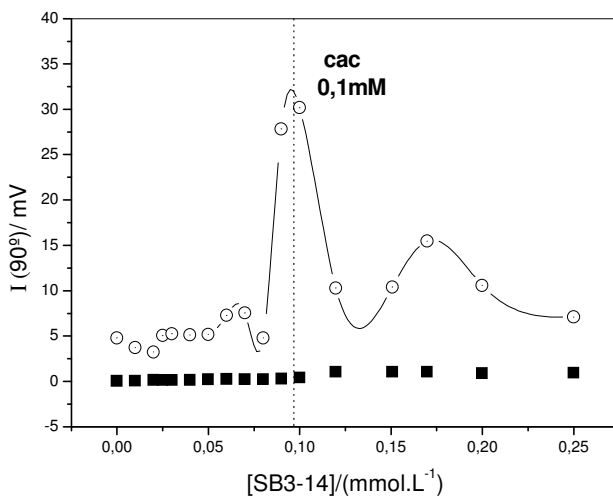


Figura 48. Intensidade de luz espalhada a 90° para o sistema e SB3-14/Lentinan (■) na ausência (○) e na presença de 0,5mg.mL⁻¹ de Lentinan .

Como pode ser visto nas Figuras 47 e 48, à medida que se aumenta a concentração de surfactante na solução contendo lentinan ocorre um aumento na intensidade de espalhamento atingindo um valor de máximo e decrescendo logo em seguida. Esse comportamento é uma evidência da formação de agregados Polímero/Surfactante.

No início da interação cooperativa, a presença de poucas moléculas de surfactante é suficiente para relaxar a conformação estrutural das cadeias, levando a um aumento do volume ocupado por estas e, conseqüentemente, a um aumento da intensidade de espalhamento. Todavia, adições posteriores de surfactante levam a saturação do polissacarídeo por monômeros de surfactante, resultando então na formação de micelas livres em solução. Neste caso, o laser ao incidir na amostra encontra muitos objetos de tamanho menor (micelas livres e monômeros de surfactante) diminuindo a intensidade de espalhamento. Embora o tamanho dos agregados formados entre surfactante e polímero sejam maiores que o tamanho das micelas livres, eles pouco contribuem (após a saturação) no aumento da intensidade de espalhamento devido ao excesso de micelas livres que se encontram na solução.

Este comportamento comprova que moléculas de surfactante estão se ligando à cadeia polimérica e indica novamente o valor da *cac*.

A polarizabilidade dada por α (Equação 21) neste caso não é alterada, pois o polissacarídeo e os surfactantes em estudo são neutros.

4.6.4 Medidas de Fluorescência para os sistemas LT-Dod/SB3-12 e LT-Dod/SB3-14.

Na Figura 49 têm-se os perfis de fluorescência para a SB3-12 na ausência e na presença de LT-Dod. Observa-se o início da associação do surfactante com o polímero, *cac* em $0,97 \text{ mmol.L}^{-1}$ de SB3-12, fim do segundo platô, enquanto que a *cmc* ocorre em $2,90 \text{ mmol.L}^{-1}$ de SB3-12.

Os parâmetros de associação obtidos para o sistema LT-Dod/SB3-14 estão representados na figura 50. A *cac*, obtida foi de $0,12 \text{ mmol.L}^{-1}$ de SB3-14.

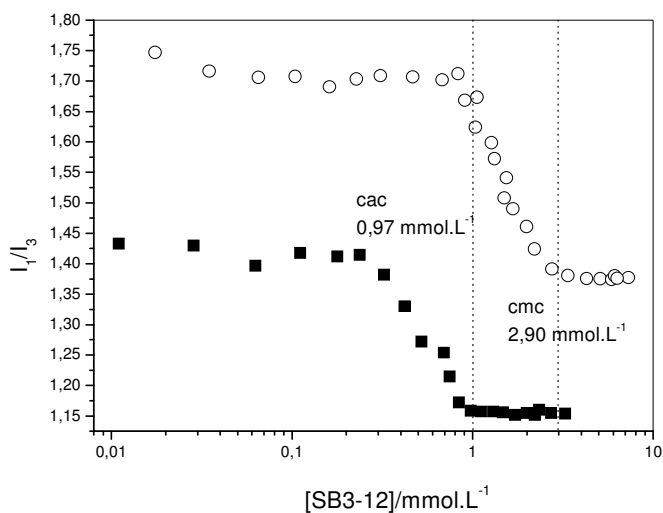


Figura 49. Razão I_1/I_3 vs. Concentração de SB3-12 na ausência (\circ) e na presença de $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ de lentinan (\blacksquare).

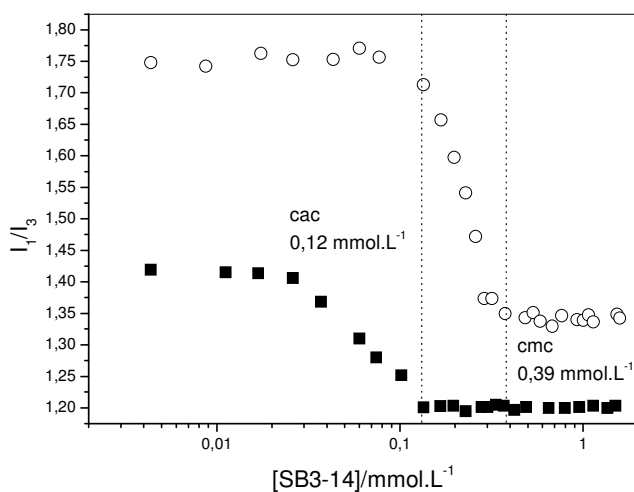


Figura 50. Razão I_1/I_3 vs. Concentração de SB3-14 na ausência (\circ) e na presença de $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ de LT-Dod(\blacksquare).

Tabela 11. Concentração de agregação crítica obtidos por fluorescência para o LT e LT-Dod.

	LT/SB3-12	LT-Dod/SB3-12	LT/SB3-14	LT-Dod/SB3-14
cac (mmol.L ⁻¹)	1,70	0,97	0,20	0,12

Ao compararmos as curvas de fluorescência dos sistemas polímero/surfactante com as curvas obtidas para o polímero modificado, observa-se que a *cac* para os sistemas LT-Dod/SB3-12 e LT-Dod/SB3-14 possuem valores menores quando comparados aos valores LT/SB3-12 e LT/SB3-14 (ver Tabela 11). Esses resultados mostram que a interação polímero/surfactante é mais intensa no LT-Dod, devida a sua maior hidrofobicidade, pois no caso de polímeros hidrofobicamente modificados, quando o surfactante é adicionado ocorre uma forte interação com os grupos hidrofóbicos do polímero, como pode ser observado na Figura 51.

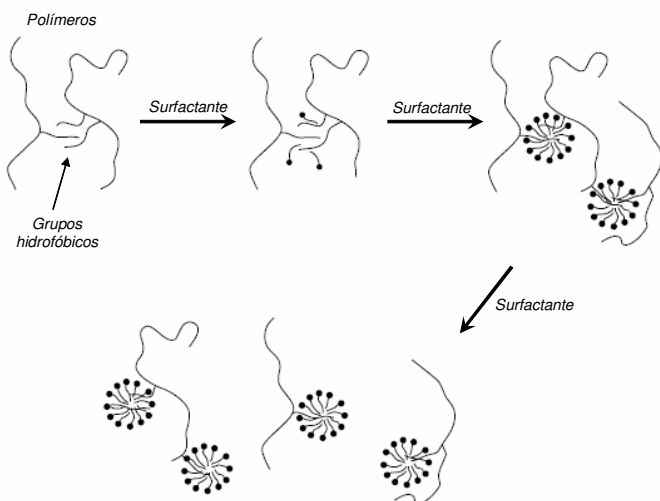


Figura 51. Auto-organização de polímeros hidrofobicamente modificados e sua associação com surfactantes [4].

5.CONCLUSÕES

- Os resultados obtidos por IV e RMN de ^{13}C , mostraram que o Polissacarídeo extraído do Cogumelo Shiitake foi uma β -D-Glucana, com cadeia principal 1 \rightarrow 3 e cadeia lateral 1 \rightarrow 6, contendo duas moléculas de glicose ligadas em posições 1 \rightarrow 6 para cada cinco moléculas de glicose ligadas em posição 1 \rightarrow 3.
- As análises de espalhamento de luz estático revelaram uma $M_{w,app} = 9,69 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$, um raio de Giro 154 nm e $A_2 = 1,01 \times 10^{-3} \text{ mL.mol.L}^{-2}$ para o Lentinan em solução aquosa 20 mmol.L $^{-1}$ NaOH. O valor positivo do Segundo coeficiente virial A_2 indica que a solução 20 mmol.L $^{-1}$ NaOH é um bom solvente para o lentinan.
- Através da técnica de espalhamento de luz dinâmico foram obtidos os valores de raio hidrodinâmico para o lentinan em solução aquosa de NaOH. Observou-se uma gradual diminuição do R_H com o aumento da concentração de NaOH, sugerindo a quebra das ligações de hidrogênio intra e intermoleculares que mantêm as cadeias de lentinan unidas na forma de hélice tripla.
- A técnica de SAXS mostrou-se uma ferramenta muito útil no estudo da conformação e morfologia do lentinan. Através dessa técnica concluiu-se que o lentinan em pó não possui formação de estrutura fractal, enquanto que em solução aquosa variando de 0 mmol.L $^{-1}$ -100 mmol.L $^{-1}$ NaOH apresentou uma estrutura fractal de volume. A determinação do Raio de Giração lateral do lentinan e a análise do gráfico de Kratky confirmaram o que já tinha sido sugerido através da análise dos valores de R_H : A transição da forma de tripla-hélice para hélice simples das cadeias de Lentinan.
- A modificação hidrofóbica do lentinan utilizando o método de Steglich foi possível, resultando em um derivado com 10% de grupos dodecanoato. O produto da modificação hidrofóbica do Lentinan foi caracterizado usando a técnica de RMN de ^{13}C , através da qual foi possível identificar os sinais característicos do grupo dodecanoato introduzido na estrutura do lentinan.

- Os Resultados de fluorescência para o lentinan modificado indicaram uma maior hidrofobicidade quando comparado com o polímero não modificado confirmando assim a esterificação.
- Os altos valores de massa molar aparente, raio de giração e raio hidrodinâmico obtidos para o LT-Dod são devidos a introdução dos grupos dodecanoato e também pela formação de agregados do polissacarídeo modificado em solução, provocada pela introdução desses grupos hidrofóbicos.
- A área ocupada por molécula de SB3-12 na interface ar-água é maior que a área ocupada por molécula de SB3-14. Esses valores mostram que quanto maior a hidrofobicidade das cadeias de surfactante, maior é a tendência dessas cadeias em migrar do meio da solução para a interface ar/solvente resultando numa superfície mais empacotada.
- Os dados obtidos através das técnicas de fluorescência, tensão superficial e espalhamento de luz, mostraram um processo de associação cooperativa entre o lentinan e os surfactantes SB3-12 e SB3-14.
- As análises de fluorescências obtidas para os sistemas LT-Dod/SB3-12 e LT-Dod/SB3-14 mostraram que a formação de agregados polímero/surfactante ocorrem em concentrações menores de surfactante, quando comparado com a formação de complexos polímero/surfactante para o lentinan não modificado. Isso ocorre devido a uma forte interação da cauda do surfactante (parte apolar) com os grupos hidrofóbicos do polímero modificado (LT-Dod).

6. REFERÊNCIAS

1. SILVA, M.L., et al., Caracterização química de glucanas fúngicas e suas aplicações biotecnológicas, **Química Nova**, 29, 2006, 85-92.
2. TADROS, T.F., **Applied Surfactants-Principles and Applications**, 2005.
3. JIN Z. ZHANG, Z.-L.W., JUN LIU, SHAOWEI CHEN , GANG-YU LIU, **Self-Assembled Nanostructures**, 2004.
4. KRISTER HOLMBERG, B.J.O., BENGT KRONBERG AND BJÖRN LINDMAN, **Surfactants and Polymers in Aqueous Solution**, 2002.
5. SHAW, D.J., **Introduction to Colloid and Surface Chemistry**, 4 ed., 1992.
6. MINATTI, E., Um Novo Modelo Para A Interação Entre Polímeros Neutros Hidrossolúveis e Surfactantes Universidade Federal de Santa Catarina, 1998.
7. ROSEN, M.J., **Surfactants and interfacial Phenomena**, 3 ed., 2004.
8. CANEVAROLO, S., **Ciência dos Polímeros**, Artiber Editora, 2002.
9. SUN, S.F., **Physical Chemistry of Macromolecules**, John Wiley & Sons, 2004.
10. EDENS, R.E., **Polysaccharides: Structural Diversity and Functional Versatility**, 2005.
11. ROBERT T. MORRISON , R.N.B., **Organic Chemistry**, 6 ed., Prentice Hall, 1992.
12. DIAS, R., Isolamento e caracterização do Lentinan de cogumelos shiitake cultivados em Santa Catarina, Universidade Federal de Santa Catarina, 2005.
13. YANG, L., ZHANG, L.-M., Chemical structural and chain conformational characterization of some bioactive polysaccharides isolated from natural sources, **Carbohydrate Polymers**, 76, 2009, 349-361.

14. BORSALI, R., PECORA, R., BURCHARD, W., **Light Scattering from Polysaccharides as Soft Materials**, Soft Matter Characterization, Springer Netherlands, 2008, pp. 463-603.
15. MORESI, M., LO PRESTI, S., MANCINI, M., Rheology of scleroglucan dispersions, **Journal of Food Engineering**, 50, 2001, 235-245.
16. ZHANG, Y., et al., Advances in lentinan: Isolation, structure, chain conformation and bioactivities, **Food Hydrocolloids**, 25, 196-206.
17. YANAKI, T., et al., Correlation between the antitumor activity of a polysaccharide schizophyllan and its triple-helical conformation in dilute aqueous solution, **Biophysical Chemistry**, 17, 1983, 337-342.
18. ZHANG, L., et al., Correlation between antitumor activity, molecular weight, and conformation of lentinan, **Carbohydrate Research**, 340, 2005, 1515-1521.
19. ZHANG, M., et al., Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity, **Trends in Food Science & Technology**, 18, 2007, 4-19.
20. ANN-TECK YAP , M.-L.N., An Improved Method for the Isolation of Lentinan from the Edible and Medicinal Shiitake Mushroom, *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (Agaricomycetidae), **International J. of Medicinal Mushrooms**, 3, 2001, 9-19.
21. ZHANG, P., ZHANG, L., CHENG, S., Chemical Structure and Molecular Weights of $\alpha(1\rightarrow3)\text{-}\beta\text{-D-Glucan}$ from *Lentinus edodes*, **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, 63, 1999, 1197-1202.
22. CHIHARA, G., et al., Fractionation and purification of the polysaccharides with marked antitumor activity, especially lentinan, from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (an edible mushroom), **Cancer Research**, 30, 1970, 2776-2781.
23. CHIHARA, G., et al., Antitumor and metastasis-inhibitory activities of lentinan as an immunomodulator: an overview, **Cancer detection and prevention. Supplement : official publication of the International Society for Preventive Oncology, Inc**, 1, 1987, 423-443.

24. DESLANDES, Y., MARCHESSAULT, R.H., SARKO, A., Triple-Helical Structure of(1-->3)-B-D-Glucan, **Macromolecules**, 13, 1980, 1466-1471.
25. XU, X., et al., Collapse and Association of Denatured Lentinan in Water/Dimethylsulfoxide Solutions, **Biomacromolecules**, 5, 2004, 1893-1898.
26. ZHANG, X., ZHANG, L., XU, X., Morphologies and conformation transition of lentinan in aqueous NaOH solution, **Biopolymers**, 75, 2004, 187-195.
27. WANG, X., XU, X., ZHANG, L., Thermally Induced Conformation Transition of Triple-Helical Lentinan in NaCl Aqueous Solution, **The Journal of Physical Chemistry B**, 112, 2008, 10343-10351.
28. XU, X., et al., Renaturation of triple helical polysaccharide lentinan in water-diluted dimethylsulfoxide solution, **Carbohydrate Research**, 345, 2009, 419-424.
29. SURENJAV, U., et al., Structure, Molecular Weight And Bioactivities Of (1→3)-B-D-Glucans And Its Sulfated Derivatives From Four Kinds Of Lentinus Edodes, **Chinese Journal of Polymer Science (CJPS)**, 23, 2005, 327-336
30. FENG, Y., et al., Rapid and efficient microwave-assisted sulfate modification of lentinan and its antioxidant and antiproliferative activities in vitro, **Carbohydrate Polymers**, 82, 605-612.
31. FIJAN, R., SOSTAR-TURK, S., LAPASIN, R., Rheological study of interactions between non-ionic surfactants and polysaccharide thickeners used in textile printing, **Carbohydrate Polymers**, 68, 2007, 708-717.
32. BARCK, M., STENIUS, P., Interactions between carboxymethyl cellulose and cationic surfactants 1. Phase equilibria and surface tensions, **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, 89, 1994, 59-69.
33. BELLETTINI, I.C., Complexos Supramoleculares formados por um polieletrólito e surfactantes, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

34. FILHO, R.P.V., Aplicação de Polissacarídeo em emulsão Cosmética: Análises Reológicas, Univerdidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.
35. SILVERSTEIN, R.M., BASSLER, G.C., Spectrometric identification of organic compounds, **Journal of Chemical Education**, 39, 1962, 546.
36. CAPEK, P., et al., Characterization of immunomodulatory polysaccharides from *Salvia officinalis* L, **International Journal of Biological Macromolecules**, 33, 2003, 113-119.
37. QIAN, J.-Y., et al., Adulteration identification of some fungal polysaccharides with SEM, XRD, IR and optical rotation: A primary approach, **Carbohydrate Polymers**, 78, 2009, 620-625.
38. SEGUCHI, M., KUSUNOSE, C., Lipophilization of curdlan granules by heat-treatment or chlorination, **Food Hydrocolloids**, 15, 2001, 177-183.
39. GONZAGA, M.L.C., et al., Isolation and characterization of polysaccharides from *Agaricus blazei* Murill, **Carbohydrate Polymers**, 60, 2005, 43-49.
40. E. F. LUCAS, B.G.S., E. E. C. MONTEIRO, **Caracterização de Polímeros**, Rio de Janeiro, 2001.
41. RAMAN, C., The molecular scattering of light, **Proceedings Mathematical Sciences**, 37, 1953, 342-349.
42. LIEBL, M., Blue Skies, Coffee Creamer, and Rayleigh Scattering, **The Physics Teacher**, 48, 300-301.
43. TERAOKA, I., **Polymer Solutions: An Introduction to Physical Properties**, John Wiley & Sons, Inc, 2002.
44. SCHÄRTL, W., **Light Scattering from Polymer Solutions and Nanoparticle Dispersions**, 2007.
45. PECORA, R., **Dynamic light scattering**, Springer, California, 1985.
46. KENNEDY, J.F., THORLEY, M., Introduction to Soft Matter: Polymers, Colloids, Amphiphiles and Liquid Crystals: I.W. Hamley; Wiley,

Chichester, 2000, 342 pages, ISBN 0-471-89951-8 (£65.00), **Carbohydrate Polymers**, 44, 2001, 78-78.

47. YUGUCHI, Y., Nano-Structure Analysis of Sugar Chains by Small Angle X-ray Scattering, **Trends in Glycoscience and Glycotechnology**, 21, 2009, 1-12.

48. BORSALI, R., PECORA, R., NARAYANAN, T., **Synchrotron Small-Angle X-Ray Scattering**, Soft Matter Characterization, Springer Netherlands, 2008, pp. 899-952.

49. SVERGUN, D.I., **Structure analysis by small-angle x-ray and neutron scattering** Plenum Press, New York, 1987.

50. TURRO, N.J., ARORA, K.S., Pyrene as a photophysical probe for intermolecular interactions of water-soluble polymers in dilute solutions, **Polymer**, 27, 1986, 783-796.

51. ZANETTE, D., et al., The absence of cooperative binding in mixtures of sodium cholate and poly(ethylene oxide) as indicated by surface tension, steady-state fluorescence and electrical conductivity measurements, **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, 279, 2006, 87-95.

52. SCHWEITZER, B., et al., Competitive Process of Binding Between the Anionic Surfactants Sodium Dodecyl Sulfate and Sodium Cholate in Bovine Serum Albumin, **Macromolecular Symposia**, 229, 2005, 208-216.

53. WINNIK, M.A., BYSTRYAK, S.M., SIDDIQUI, J., Interaction of Pyrene-Labeled Poly(ethylene imine) with Sodium Dodecyl Sulfate in Aqueous Solution, **Macromolecules**, 32, 1999, 624-632.

54. SILVA, M., Utilização do pireno como uma sonda fluorescente na investigação de ligações intermoleculares em misturas binárias de solventes, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.

55. FELIPPE, A.C., et al., Self-association of sodium cholate with poly(ethylene oxide) cooperatively induced by sodium dodecyl sulfate, **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, 294, 2007, 247-253.

56. WINNIK, F.M., REGISMOND, S.T.A., Fluorescence methods in the study of the interactions of surfactants with polymers, **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, 118, 1996, 1-39.
57. ADAMSON, A.W., **Physical Chemistry of Surfaces**, 6 ed., John Willey and Sons, 1997.
58. BÓ, A.D., et al., Ethyl(hydroxyethyl)cellulose-sodium dodecanoate interaction investigated by surface tension and electrical conductivity techniques, **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, 256, 2005, 171-180.
59. TAYLOR, D.J.F., THOMAS, R.K., PENFOLD, J., Polymer/surfactant interactions at the air/water interface, **Advances in Colloid and Interface Science**, 132, 2007, 69-110.
60. RODRÍGUEZ, A., et al., Effects of glycols on the thermodynamic and micellar properties of TTAB in water, **J. Colloid Interface Sci.**, 338, 2009, 207-215.
61. W. STEGLICH, B.N., Simple Method for the Esterification of Carboxylic Acids, **Angewandte Chemie International Edition**, 17, 1978, 522-524.
62. HEINZE, T., LIEBERT, T., KOSCHELLA, A., **Esterification of Polysaccharides**, Springer, Berlin, 2006.
63. CHEN, X., et al., Flexible chain conformation of (1 → 3)-[β]-d-glucan from *Poria cocos* sclerotium in NaOH/urea aqueous solution, **Carbohydrate Polymers**, 75, 2009, 586-591.
64. ZHANG, P., ZHANG, L., CHENG, S., Solution properties of an [α]-(1 → 3)-glucan from *Lentinus edodes* and its sulfated derivatives, **Carbohydrate Research**, 337, 2002, 155-160.
65. PEREIRA, F.V., MERLO, A.A., DA SILVEIRA, N.P., Behaviour of mesogenic side group polyacrylates in dilute and semidilute regime, **Polymer**, 43, 2002, 3901-3908.
66. XU, X., et al., Rheology of triple helical Lentinan in solution: Steady shear viscosity and dynamic oscillatory behavior, **Food Hydrocolloids**, 22, 2008, 735-741.

67. PROVENCHER, S.W., inverse problems in polymer characterization: Direct analysis of polydispersity with photon correlation spectroscopy., **Makromolekulare Chemie**, 201, 1979.
68. ZHANG, et al., **Transition from triple helix to coil of Lentinan in solution measured by SEC, viscometry, and ^{13}C NMR**, Nature Publishing Group, Avenel, NJ, ETATS-UNIS, 2002.
69. SORENSEN, C.M., WANG, G.M., Size distribution effect on the power law regime of the structure factor of fractal aggregates, **Physical review. E, Statistical physics, plasmas, fluids, and related interdisciplinary topics**, 60, 1999, 7143-7148.
70. RICE, S.A., Small angle scattering of X-rays. A. Guinier and G. Fournet. Translated by C. B. Wilson and with a bibliographical appendix by K. L. Yudowitch. Wiley, New York, 1955. 268 pp. \$7.50, **Journal of Polymer Science**, 19, 1956, 594-594.
71. STRIBECK, N., **X-Ray Scattering of Soft Matter**, Springer Laboratory Manuals in Polymer Science, 2007.
72. TADA, T., MATSUMOTO, T., MASUDA, T., Structure of molecular association of curdlan at dilute regime in alkaline aqueous systems, **Chemical Physics**, 228, 1998, 157-166.
73. PISÁRCIK, M., et al., Area per surfactant molecule values of gemini surfactants at the liquid-hydrophobic solid interface, **J. Colloid Interface Sci.**, 289, 2005, 560-565.
74. WINTGENS, V., et al., Aqueous Polysaccharide Associations Mediated by Cyclodextrin Polymers, **Biomacromolecules**, 9, 2008, 1434-1442.
75. DEL MAR GRACIANI, M., et al., Micellar Solutions of Sulfobetaine Surfactants in Water–Ethylene Glycol Mixtures: Surface Tension, Fluorescence, Spectroscopic, Conductometric, and Kinetic Studies, **Langmuir**, 21, 2005, 7161-7169.